



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE KAROTENOIDŮ A OBOHACENÉ KVASINKOVÉ BIOMASY NA ŘEPKOVÝCH ODPADECH

PRODUCTION OF CAROTENOIDS AND ENRICHED YEAST BIOMASS ON RAPE-SEED WASTE
SUBSTRATES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

NADZEYA MIKHEICHYK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0827/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Nadzeya Mikheichyk	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Produkce karotenoidů a obohacené kvasinkové biomasy na řepkových odpadech

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - kultivace mikroorganismů na odpadech, charakterizace řepkových odpadů.
2. Testování a optimalizace kultivačních podmínek pro kultivaci karotenogenních kvasinek s využitím odpadních řepkových substrátů v různém uspořádání.
3. Vyhodnocení růstu a výtěžku vybraných kvasinkových metabolitů na řepkových výliscích, srovnání s jinými typy substrátů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Nadzeya Mikheichyk
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Karotenoidy patří k nejrozšířenějším přirozeným pigmentům s významnými biologickými účinky. V poslední době se intenzivně zkoumá mikrobiologická produkce karotenoidů namísto syntetické výroby. Cílem práce je studium produkčních vlastností karotenogenních kvasinek na odpadním řepkovém substrátu.

Tato práce je srovnávací studií tří kmenů karotenogenních kvasinek: *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* a *Cystofilobasidium capitatum*. Kvasinky byly kultivované na různých živných médiích, kde se jako nutriční zdroj používal vybraný odpadní materiál - řepkový substrát dvou typů, které se od sebe lišily obsahem lipidů.

U všech kmenů byly provedeny růstové charakteristiky na řepkovém substrátu prvního typu s nižším obsahem lipidů. Všechny studované kmeny byly schopny využívat použité odpadní substráty jako zdroj živin. Většina kmenů produkovala zvýšené množství karotenoidů, v některých případech bylo doprovázeno i relativně vysokou produkcí biomasy. Jako potenciálně nejlepšími producenty obohacené biomasy se prokázaly kvasinky *Rhodotorula glutinis* a *Sporobolomyces roseus*, které měly nejvyšší produkci všech metabolitů i biomasy v médiích s poměrem řepka“glukóza 1:3 a 1:1.

Z výsledků vyplývá, že využití řepkového substrátu jako možného zdroje uhlíku ke kultivaci karotenogenních kvasinek a produkci karotenoidů a vybraných lipidů se jeví jako vhodná varianta do určitého poměru daného odpadu. Úprava řepkového substrátu s následnou kultivací je vhodný cíl k dalšímu studiu v navazujících pracích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenoidy, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula glutinis*, odpadové substráty, řepka

ABSTRACT

Carotenoids belong to the group of the most widely used natural pigments with significant biological effects. Recently, microbiological production of carotenoids prior synthetic production is examined. The aim to the study was to analyse the properties of carotenogenic yeasts on waste rapeseed substrate.

The main purpose of this thesis was conceived as a comparative study of three strains of carotenogenic yeasts: *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* a *Cystofilobasidium capitatum*. Yeasts were cultivated on different nutrient media, in which selected waste material was used as a nutritional source - rape substrate of two types with different lipid content.

For all strains the growth characteristics on rapeseed substrate of the first type with a lower content of lipids were performed. All tested strains were able to use waste substrates as a source of nutrients. Most of strains produced increased amounts of carotenoids, in some cases accompanied with a relatively high production of biomass. As a potentially best producer of enriched biomass yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Sporobolomyces roseus* were showed. They exhibited the highest production of biomass and metabolites in the media with the ratio glucose:rapeseed cake 3:1 and 1:1..

The results showed that rapeseed cake can be used as a potential carbon source for growth of carotenogenic yeasts and production of carotenoids and selected lipids to some limit ratio of waste. Further processing of rapeseed cake could be a suitable target for following study in related works.

KEYWORDS

Carotenoids, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula glutinis*, waste substrates, rapeseed residue

MIKHEICHYK, N. PRODUKCE KAROTENOIDŮ A OBOHACENÉ KVASINKOVÉ BIOMASY NA ŘEPKOVÝCH ODPADECH. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 57 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem školitele bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala mé vedoucí doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za účinnou metodickou a pedagogickou pomoc a další rady při zpracování mé bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Andree Háronikové za velikou ochotu a pomoc při řešení experimentální části práce.

Práce byla podpořena z prostředků projektu "Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně" registrovaného pod číslem CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Karotenoidy a jejich funkce	10
2.1.1	Co to jsou karotenoidy	10
2.1.2	Chemická struktura	10
2.1.3	Funkce karotenoidů	11
2.1.4	Biosyntéza karotenoidů u mikroorganismů	11
2.2	Kvasinková biomasa.....	12
2.2.1	Charakteristika kvasinek	12
2.2.2	Cytologie kvasinek.....	13
2.2.3	Buněčná stěna	13
2.2.4	Cytoplazmatická membrána	13
2.2.5	Cytoplazma.....	13
2.3	Rozmnožování kvasinek.....	14
2.3.1	Pohlavní rozmnožování	14
2.3.2	Využití kvasinek podle syntézy metabolitů	15
2.4	Karotenogenní kvasinky: rody <i>Rhodotorula</i>, <i>Cystofilobasidium</i>, <i>Sporobolomyces</i>, <i>Xanthophyllomonas</i>	15
2.4.1	Obecná charakteristika karotenogenních kvasinek	15
2.4.2	Rod <i>Rhodotorula</i>	15
2.4.3	Rod <i>Sporobolomyces</i>	16
2.4.4	Rod <i>Cystofilobasidium</i>	16
2.4.5	Rod <i>Xanthophyllomonas</i>	16
2.5	Kvasinkový růst – kultivace.....	16
2.5.1	Požadavky kvasinek na růst.....	17
2.5.2	Fyzikální požadavky	17
2.5.3	Teplota	17
2.5.4	Vodní potenciál	17
2.5.5	pH prostředí	17
2.5.6	Kyslík	17
2.5.7	Jiné faktory prostředí	18
2.5.8	Nutriční požadavky.....	18
2.6	Odpadní substráty.....	18
2.6.1	Odpadní substráty využitelné ke kultivaci kvasinek	18
2.6.2	Lipidové odpadní substráty.....	18
2.6.2.1	Glycerol.....	18
2.6.2.2	Řepka olejka (<i>Brassica napus</i>)	19

2.7	Analýza sledovaných kvasinkových metabolitů.....	20
2.7.1	HPLC/PDA.....	20
2.7.2	Hmotnostní spektroskopie MS.....	21
2.7.3	Praktické využití HPLC ve spojení s MS	21
3	CÍLE PRÁCE	23
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1	Materiály a chemikálie.....	24
4.1.1	Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek	24
4.1.2	Chemikálie použité pro izolaci karotenoidů.....	24
4.1.3	Chemikálie použité pro HPLC stanovení	24
4.2	Přístroje a pomůcky	24
4.2.1	Přístroje a pomůcky použité při kultivaci kvasinek	24
4.2.2	Použité přístroje a pomůcky k izolaci a stanovení karotenoidů	24
4.2.3	Kvasinkovité kmeny.....	25
4.2.4	Složky kultivačních médií	25
4.3	Postupy práce.....	25
4.3.1	Kultivace mikroorganismů	25
4.3.1.1	Kultivace karotenogenních kmenů	25
4.3.1.2	Inokulum I.....	25
4.3.1.3	Inokulum II.....	25
4.3.1.4	Produkční média.....	26
4.3.1.5	Stanovení redukujících sacharidů metodou Somogyiho-Nelsona	26
4.3.1.6	Stanovení zákalu turbidimetricky	27
4.3.1.7	Zpracování biomasy.....	27
4.3.1.8	Růstová křivka	27
4.3.1.9	Stanovení sušiny gravimetricky	27
4.3.2	Izolace a analýza karotenoidů	28
4.3.2.1	Izolace karotenoidů zmýdlením	28
4.3.2.2	Extrakce	28
4.3.2.3	Analýza karotenoidů metodou HPLC/PDA.....	28
4.3.2.4	Podmínky separace.....	28
4.3.2.5	Identifikace a kvantifikace karotenoidů	28
5	VÝSLEDKY	29
5.1	Růstová charakteristika	29
5.1.1	Kalibrační závislost biomasy a zákalu	29
5.1.1.1	Růstová křivka kvasinky <i>Cystofilobasidium capitatum</i> 10-1-2 (kultivace na glukóze).....	29
5.1.1.2	Růstová křivka kvasinky <i>Cystofilobasidium capitatum</i> 10-1-2 (kultivace na řepce)	30
5.1.1.3	Růstová křivka kvasinky <i>Cystofilobasidium capitatum</i> 10-1-1 (kultivace na glukóze).....	32
5.1.1.4	Růstová křivka kvasinky <i>Cystofilobasidium capitatum</i> 10-1-1 (kultivace na řepce)	32

5.1.1.5	Růstová křivka kvasinky <i>Rhodotorula glutinis</i> (kultivace na glukóze).....	34
5.1.1.6	Růstová křivka kvasinky <i>Rhodotorula glutinis</i> (kultivace na řepce).....	34
5.1.1.7	Růstová křivka kvasinky <i>Sporobolomyces roseus</i> (kultivace na glukóze)	35
5.1.1.8	Růstová křivka kvasinky <i>Sporobolomyces roseus</i> (kultivace na řepce).....	35
5.1.2	Produkce karotenoidů v průběhu růstu různých kmenů kvasinek.....	36
5.1.2.1	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> 10-1-2 (kultivace na glukóze).....	37
5.1.2.2	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> 10-1-2 (řepka 1)	37
5.1.2.3	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> 10-1-1 (kultivace na glukóze).....	38
5.1.2.4	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> 10-1-1 (řepka - 1)	38
5.1.2.5	<i>Sporobolomyces roseus</i> (kultivace na glukóze).....	39
5.1.2.6	<i>Sporobolomyces roseus</i> (řepka - 1)	40
5.1.2.7	<i>Rhodotorula glutinis</i> (kultivace na glukóze)	41
5.1.2.8	<i>Rhodotorula glutinis</i> (řepka 1).....	41
5.2	Kultivace karotenogenních kvasinek, morfologické a produkční vlastnosti	42
5.2.1	Morfologické a růstové charakteristiky studovaných karotenogenních kvasinek kultivovaných na řepkovém substrátu	42
5.2.1.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	42
5.2.1.2	<i>Sporobolomyces roseus</i>	43
5.2.1.3	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	45
5.2.2	Analýza karotenoidů a vybraných lipidických látek	46
5.2.2.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	47
5.2.2.2	<i>Sporobolomyces roseus</i>	48
5.2.2.3	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	49
6	ZÁVĚR.....	52
7	LITERATURA	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	56

1 ÚVOD

Karotenoidy patří k nejrozšířenějším přirozeným pigmentům s důležitými biologickými vlastnostmi. Volně se vyskytují u většiny rostlin jako součást fotosyntetického aparátu. Také byly prokázány u některých druhů kvasinek, kde jsou součástí buněčné membrány a plní zde funkci fotoprotekce. Jejich přítomnost je patrná také v ovoci a zelenině a nejčastěji se projevuje žlutým, oranžovým, až červeným zabarvením. Živočichové přijímají karotenoidy hlavně s potravou, protože nejsou schopni si je syntetizovat sami, ale mohou přeměňovat rostlinné karotenoidy na vlastní formy. V lidském organismu karotenoidy plní funkci biologických antioxidantů a ovlivňují imunitní systém. Slouží jako metabolické prekurzory vitaminů a hormonů. Jsou také zdrojem provitaminu A, který je důležitý pro zrak, také jako prevence proti kardiovaskulárním onemocněním a snižují riziko vzniku rakoviny. Vyrábí se z nich množství vitaminových preparátů, potravinových doplňků a barviv, zvířatům se přidávají do krmiv.

V současné době je získávání karotenoidů extrakcí z rostlinných materiálů poměrně náročná a drahá záležitost, z tohoto důvodu jsou zkoumány možnosti optimalizace mikrobiologické produkce karotenoidů na různých odpadních substrátech. Těmito odpadními substráty mohou být různé sekundární produkty zemědělství, potravinářství a dalších odvětví. Karotenogenní kvasinky z rodů *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* a *Cystofilobasidium* patří k mikroorganismům, které jsou schopny produkovat karotenoidy ve svých buňkách. Vzhledem k významným funkcím karotenoidů a k jejich širokému množství použití se neustále studují nové možnosti jejich produkce a nejefektivnější izolace.

Předložená bakalářská práce se zabývá optimalizací metod kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních lipidických substrátech. Jako lipidický odpadní substrát byly využity výlisky řepky olejky (*Brassica napus*), které byly jediným zdrojem uhlíku v médiích. Obdobně tomu bylo i v případě médií s obsahem glukózy, přičemž typy těchto médií byly dva: první základní médium obsahovalo jenom glukózu a druhé médium obsahovalo glukózu spolu s řepkou v určitých poměrech. Na těchto médiích byly kultivovány následující kmeny karotenogenních kvasinek: *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus*. Hledala se média o takovém složení, které by mohlo vést ke zvýšené produkci karotenoidů a zároveň by negativně neovlivnilo růst buněk. Ve studii byly použity tři kmeny kvasinek, které by mohly být potenciálně průmyslově využitelné pro produkci karotenoidů a obohacené biomasy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Karotenoidy a jejich funkce

2.1.1 Co to jsou karotenoidy

Karotenoidy jsou žluté a oranžové lipofilní pigmenty rostlin, hub, řas a mikroorganismů. Vyskytují se ve všech fotosyntetizujících rostlinných pletivech, kde jsou přítomny jako fotochemické aktivní složky plastidů (rostlinných organel) nazývaných chloroplasty. Jejich přítomnost v zelených částech rostlin je často maskována chlorofylem [1].

2.1.2 Chemická struktura

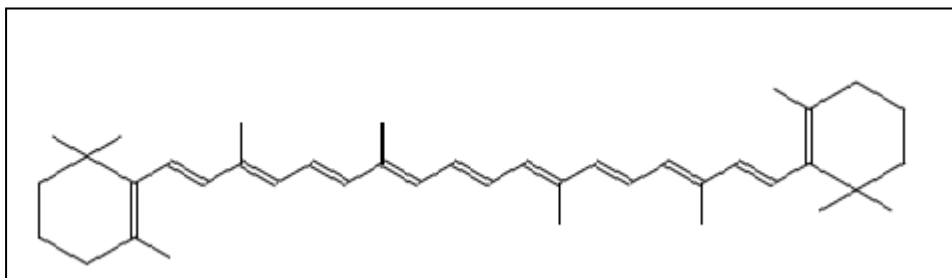
Většina karotenoidů patří do skupiny tetraterpenů. Jejich základní struktura obsahuje 8 isoprenových jednotek, mají celkem 40 uhlíků. Barevnost mají díky řetězci konjugovaných dvojných vazeb, který se vyskytuje v několika základních strukturách [1].

Dělí se na dvě hlavní skupiny:

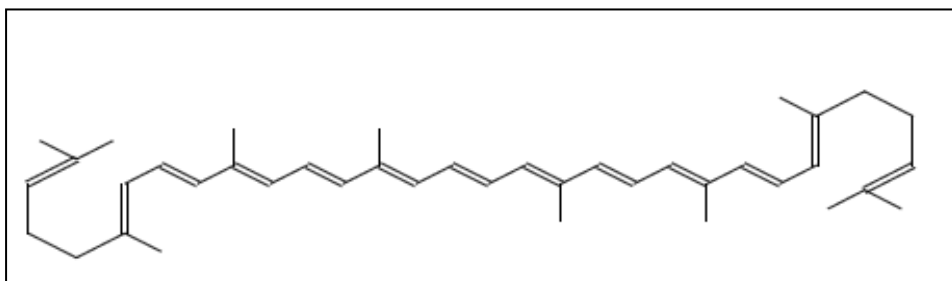
- karoteny
- kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, ketony) odvozené od karotenů, které se nazývají xantofyly.

Podle jejich rozdílné základní uhlovodíkové struktury můžeme karotenoidy rozdělit do 3 skupin:

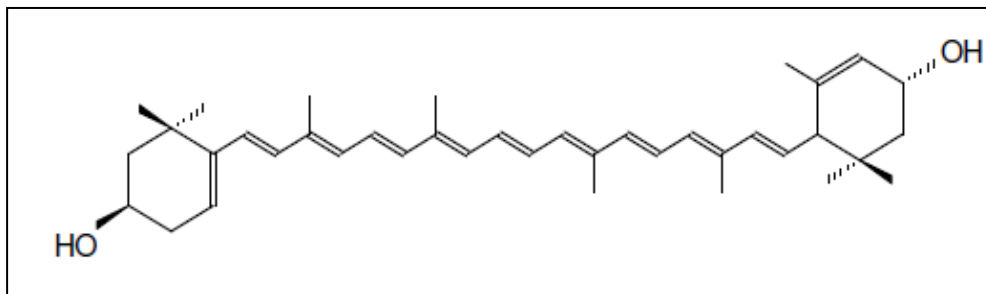
1. karotenoidy s acyklickou strukturou: lykopen
2. karotenoidy s monocyklickou strukturou: λ -karoten a δ -karoten
3. karotenoidy s bicyklickou strukturou: α - a β -karoten [2].



Obr. 1 β – karoten [3]



Obr. 2 Lykopen [3]



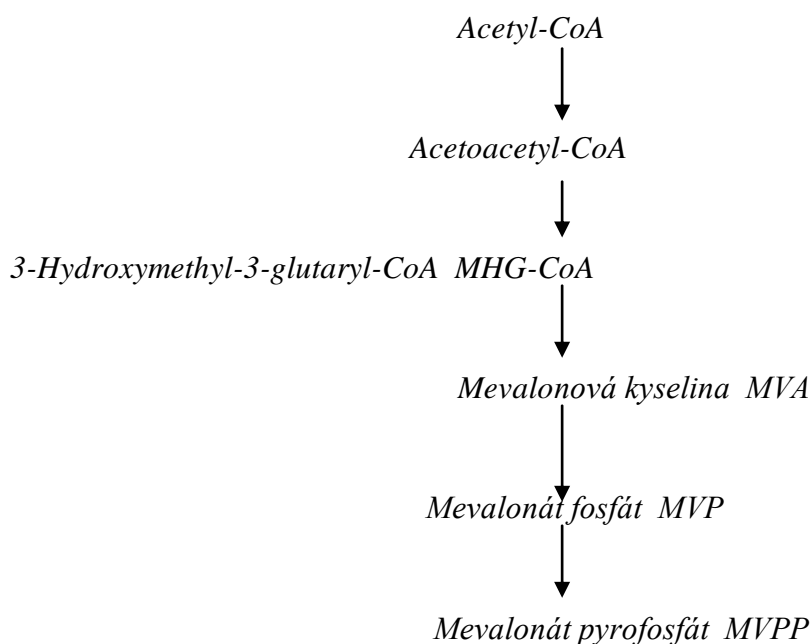
Obr. 3 Lutein [3]

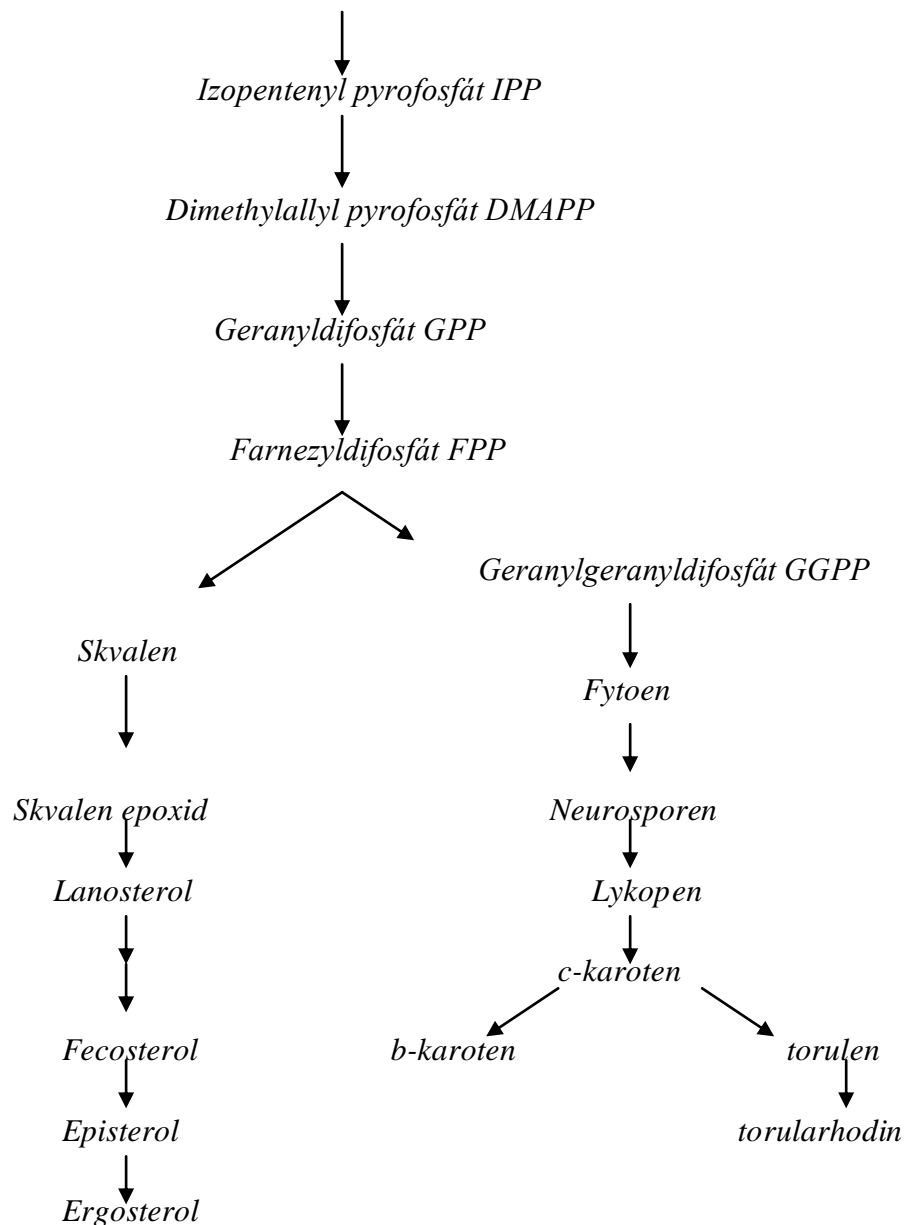
2.1.3 Funkce karotenoidů

Kombinovaným účinkem enzymů ze skupiny oxidoreduktáz, světla, tepla, kyslíku, hydroxoniových iontů a dalších faktorů může docházet k izomerii, oxidaci a degradaci karotenů. Některé karotenoidní pigmenty se jako součást čerstvé nebo sušené části rostlin nebo jako extrakty se používají k barvení potravin od nepaměti (mrkev, slupky pomerančů, rajčat). Projevují antioxidační účinky, absorbují singletový kyslík, jsou součástí fotosyntetického aparátu u rostlin, u lidí se používají jako prevence vůči různým degenerativním či kardiovaskulárním onemocněním [4].

2.1.4 Biosyntéza karotenoidů u mikroorganismů

Karotenoidní kvasinky se kultivují v kultivačních médiích, jejichž složení zaručuje velkou produkci buněčné biomasy a karotenoidů. Média by měla obsahovat malé množství dusíku a vysoký obsah uhlíku. Karotenoidy jsou v buňce kvasinek obsaženy v lipoproteinové frakci. Biosyntéza probíhá podle obecné metabolické dráhy pro izoprenoidy. Výchozí látkou pro biosyntézu karotenoidů je acetyl-CoA, postupnou kondenzací jeho tři molekul vzniká β -hydroxy- β -methylglutaryl CoA, jehož redukcí vzniká mevalonová kyselina. Mevalonová kyselina je postupně fosforylována a dekarboxylována. Výsledným produktem je pak izopentylidifosfát (tzv. aktivní izopren), který za enzymové katalýzy přejde na dimethylallyldifosfát. Následně kondenzací těchto dvou posledních meziproduktů vzniká geranyldifosfát. V aktivní fázi rozmnožování kvasinek se tvoří zejména bezbarvé karotenoidní polyeny fytoen a fytofluen. V následujících fázích se už začínají tvořit barevné pigmenty, první acyklický karotenoid lykopen a z něj zejména β -karoten, projevující se oranžovou barvou [1, 2].





Obr. 4 Biosyntéza karotenoidů z acetylCoA do β -karotenu, torulenu a torularhodinu u rodu *Rhodotorula* a kompetitivní dráha syntézy ergosterolu odvozená z izoprenové části biosyntézy [4].

2.2 Kvasinková biomasa

2.2.1 Charakteristika kvasinek

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganizmy, patřící mezi houby (*Fungi*). Tvar buněk kvasinek je rozmanitý v závislosti na stadiu vývoje a druhu živného média. Za nejčastější tvar buněk se považuje rotační elipsoid. Mohou také mít tvar kulatý, oválný, citronovitý a lahvovitý. Bylo zjištěno, že i přes dodržování stejných podmínek kultivace, může existovat určitá variabilita rozměrů buněk v rámci druhů a rodů [6].

2.2.2 Cytologie kvasinek

Vegetativní kvasinková buňka je složena ze silné buněčné stěny, jemné cytoplazmatické membrány, cytoplazmy a jádra. Jádro je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou. Vegetativní buňky kvasinky nemají pohybové orgány [7].

2.2.3 Buněčná stěna

Buněčná stěna drží tvar buňky a zároveň působí protektivně proti mechanickým vlivům prostředí. Buněčná stěna obsahuje póry, kterými prochází nízkomolekulární látky. Její hlavní složkou je síť polysacharidů (glukany), která je vyplněna bílkoviny. Obsahuje nízké množství lipidů a fosfolipidů, dále potom fosforečnany vázané esterovými vazbami na polysacharidy. Tyto fosfátové zbytky, spolu se skupinami $-COOH$ bílkovin, určují náboj buněk kvasinek jako negativní. Tento náboj ovlivňuje adsorpci látek z živného prostředí [7].

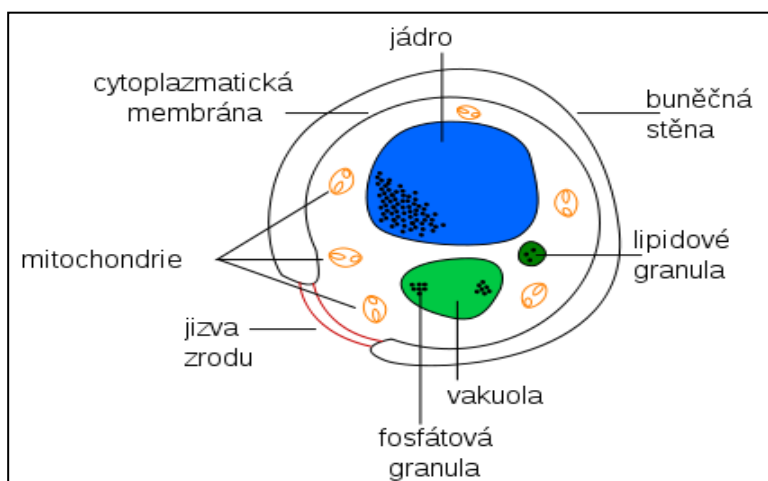
2.2.4 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána nebo-li plazmalema je tenká membrána o tloušťce 7,5-8 nm. Je složena z proteinů a lipidů. Je sídlem transportních mechanismů a umožňuje příjem či transport látek z buňky do prostředí. Je propustná pouze pro malé molekuly bez náboje, proto tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím [7].

2.2.5 Cytoplazma

Je u mladých buněk průhledná homogenní hmota, obsahující membránové útvary, tedy endoplazmatické retikulum, mitochondrie, vakuoly, Golgiho aparát a jádro. Endoplazmatické retikulum je tvořeno systémem dvojitých membrán s poměrně velkými póry. Na jejich povrchu jsou zrníčka polyzomů, ve kterých se syntetizují bílkoviny. Mitochondrie jsou sídlem dýchacích enzymů. Probíhá zde rovněž syntéza některých mitochondriálních bílkovin. Jsou nositelky mimojaderné dědičnosti, obsahují vlastní DNA i RNA. Vnitřní membrána tvoří kristy. Skládají se především z fosfolipidů, lipidů a bílkovin. Vakuola je kulovitý útvar, který je obklopený jednoduchou membránou. Uvnitř vakuol se nacházejí hydrolytické enzymy, jako jsou proteinázy, ribonukleáza a esteráza. Jsou tedy místem, kde dochází k rozkladu těchto struktur buněk, jež mají krátký poločas rozpadu (RNA a některé enzymy apod.). Dále obsahují polyfosfáty a velkou zásobu draselných iontů, aminokyselin a purinů. Golgiho aparát je membránový útvar připomínající několik propojených měchýřků uložených vedle sebe. Funkce tohoto aparátu je pravděpodobně transport prekurzorů buněčné membrány z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu [7].

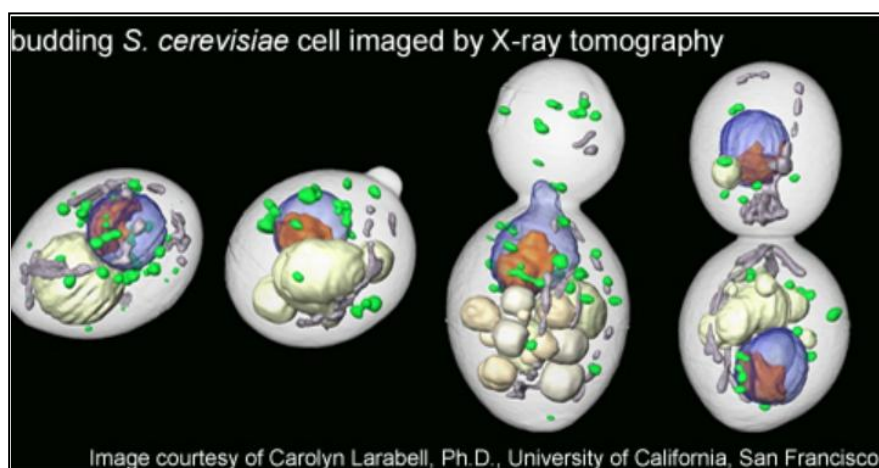
Jádro je od cytoplazmy odděleno dvojitou membránou s poměrně velkými póry. Nachází se přibližně ve středu buňky a jsou v něm umístěny chromozomy, jadérko a pólové tělísko [7].



Obr. 5 Zvětšená kvasinková buňka [7]

2.3 Rozmnožování kvasinek

Většina kvasinek se rozmnožuje pučením buněk, ale jsou i kvasinky, které se rozmnožují dělením. Při pučení vzniká malá dceřiná buňka, která je spojena kanálkem s mateřskou buňkou. Před pučením dochází ke spojení membrán endoplazmatického retikula a také k jeho dělení, pak také k opakovanému dělení vakuol. Tvar mitochondrií se mění na protáhlý. Poté, kdy se začne vytvářet pupen, do něj vstupují malé vakuoly a mitochondrie. Ve stejné době začne mitotické dělení jádra a jeho migrace k pupenu. Zároveň s jádrem přecházejí do nového pupenu další složky cytoplazmy. Potom se cytoplazmatickou membránou uzavře kanálek mezi mateřskou a dceřinou buňkou a po vytvoření buněčné stěny a spojení malých vakuol do jediné vakuoly, je pučení ukončeno. Obvykle se odrostlá dceřiná buňka ihned oddělí od mateřské [7,8].



Obr. 6 Rozmnožování kvasinek pučením [9]

2.3.1 Pohlavní rozmnožování

Mnohé kvasinky mají schopnost množit se pohlavně. Výsledkem tohoto rozmnožování jsou pohlavní spory. Na základě umístění pohlavních spor jsou kvasinky rozděleny

na *Ascomycotina*, u nichž jsou spory uloženy v asku (askospory) a *Basidiomycotina*, u nichž jsou spory umístěné vně sporotvorných buněk (exospory) [7,8].

Při pohlavním rozmnožování dochází ke spájení dvou haploidních buněk (konjugace). Následnou karyogamií vzniká diploidní jádro, které se dále dělí meiózou na čtyři haploidní jádra, která jsou základem pohlavních spor, nebo se dělí další mitózou a pak teprve vznikají spory. V životním cyklu kvasinek se pravidelně střídají haploidní a diploidní fáze [7,8].

2.3.2 Využití kvasinek podle syntézy metabolitů

Když mají kvasinky dostatek nutričních látek a potřebných faktorů pro růst, stavají se metabolicky aktivní a rostou. Růst se uskuteční ve dvou fázích. V první fázi se syntetizují buňkové komponenty a buňky rostou, v druhé fázi se zvýší množství buněk, tzv. populace. Nárůst počtu populací buňčným dělením je velmi důležitý pro mikrobiální kontrolu, biotechnologie a též pro vznik infekčních nemocí [10].

Jakmile mikroorganismy vstoupí do stacionární fáze růstu, z důvodu vyčerpání živin z média se aktivuje proces sekundárního metabolismu. Sekundární metabolismus zahrnuje procesy produkce metabolitů, které nejsou esenciální pro růst a reprodukci, ale jsou to různorodé, často specifické konečné metabolity, jako jsou alkaloidy, antibiotika, vitaminy, pigmenty, toxiny. Sekundární metabolity nejsou nezbytné pro přežití buňky, ale vystupují jako obrana a mají určité zvláštní funkce [10].

Tyto mikrobiální metabolity jsou produkovány během fermentace. Snahou je nejen zvýšení produkce těchto metabolitů, ale také snížení doby kultivace a produkčních nákladů.

Zvýšená produkce je závislá na specifickém druhu daného mikroorganismu a na environmentálních podmínkách, za kterých fermentace probíhá. Chceme-li snížit výrobní náklady, aplikujeme různé postupy, jako je například optimalizace kultivačních podmínek. Při biosyntéze kyseliny citronové se musí snížit koncentrace železa v produkčním médiu, aby se redukovala aktivita akonitázy v Krebsově cyklu. Takovým způsobem se zaručí nadprodukce kyseliny citronové. Dalším postupem pro zvýšení produkce žádoucích metabolitů může být genetické inženýrství [11].

2.4 Karotenogenní kvasinky: rody *Rhodotorula*, *Cystofilobasidium*, *Sporobolomyces*, *Xanthophyllomonas*

2.4.1 Obecná charakteristika karotenogenních kvasinek

Některé kvasinkové druhy produkují karotenogenní pigmenty, například β -karoten, torularhodin nebo torulen. Díky těmto pigmentům kvasinky mají typické červené, žluté nebo oranžové zabarvení. Z tohoto důvodu bývají tyto kvasinky často nazývány „červené“. Karotenogenní kvasinky je možné zařadit do čtyř taxonomických skupin: *Cystofilobasidiales*, *Sporidiobolales* a *Erythrobasidium*, *Tremellales* s třídou *Hymenomycetes* [12].

2.4.2 Rod *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* zahrnuje tři nejpoužívanější druhy: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula minuta*.

Kvasinky rodu *Rhodotorula* mají výrazný pentózový cyklus využití glukózy a nezkrvají žádné cukry. Tvoří malé kulaté nebo ovalné buňky, někdy také protáhlé, endospory ani jiné druhy spor nevytváří, nevytváří ani pseudomycelium. Mohou mít různou barvu, od žluté přes oranžovou až do červenofialové [12].

Rhodotorula glutinis je kvasinka, která se nachází běžně v přírodě. Je dobře známá charakteristickou produkcí torulenu, torularhodinu a β -karotenu. Dokáže akumulovat

dostatečné množství lipidů. Produkce lipidů rodem *Rhodotorula* má význam z více důvodů, zejména však proto, že usměrněním kultivace by se mohly získat lipidy s obsahem cenných mastných kyselin pro výživu živočichů, případně pro vývoj biopaliv 2. generace [12].

2.4.3 Rod *Sporobolomyces*

Rod *Sporobolomyces* obsahuje přibližně 20 druhů červených kvasinek. Nejběžnější jsou druhy *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces salmonicolor*.

Patří do skupiny *Basidiomyces* a vytváří asymetrické balistokonidie. Rod *Sporobolomyces* jsou mikroorganizmy, které se vyskytují v atmosféře, kde hlavním zdrojem výživy jsou redukované formy dusíkatých sloučenin. Kultury u *Sporobolomyces* jsou drsné, ploché a nemají kvasné schopnosti. Obsahují velké množství karotenu. Kolonie jsou tmavě červené, hladké. Buňky jsou kulovité, elipsoidní až protáhlé, s rozměry 3 až 8 x 5 až 18 µm. *Sporobolomyces* může růst jako buňka, pseudohyfa nebo pravá hyfa anebo balistokonidie. Právě hyfy a pseudohyfy jsou často dobře vyvinuté. Balistokonidie jsou jednobuněčné a mohou být umístěné převážně na vejčitých prodloužených vegetativních buňkách [12].

2.4.4 Rod *Cystofilobasidium*

Mezi zástupci tohoto rodu patří druhy *Cystofilobasidium bisporidii*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*. Tento rod se liší od rodu *Rhodotorula* typem bazidia. Jeho charakter je jednobuněčný, nedělí se, tzv. holobasidium. Tvoří také kolonie s hladkým lesklým povrchem, tvar buněk je kulatý až protáhlý [13].

Druh *Cystofilobasidium capitatum*, který má červenou až skořicovou barvu buněk, je homothalický druh, který může vytvářet jednojaderné mycelium. V hyfách je schopen produkovat endokonidie. Sporidie jsou jednotlivé nebo v párech, s jednou nebo dvěma bazidiosporami. Primární sporidia nemusejí pučít na bazidiospory, ale na septované mycelium. Po vypuštění na bazidiospory, primární sporidie degenerují a zůstávají spojené s metabasidiem. Kvasinková kultura se rozroste až po několika týdnech. Všechny generace jsou diploidní [13].

2.4.5 Rod *Xanthophyllomonas*

Nový druh červených kvasinek, patří zde například *Phaffia rhodozyma*, původně označena jako *Rhodozyma montanae*. *Phaffia rhodozyma* vytváří elipsoidní buňky s rozměry 2,8 až 7,5 nebo 5,5 až 10,5 µm, buď jednotlivě nebo v párech anebo v krátkých řetězcích. Kromě pučících buněk vytváří chlamydospory, velké, kulovité buňky. V kapalném prostředí vytváří sediment, prstenec i kožku. Na agaru se tvoří pomerančovo červený hladký, trochu skládaný nátěr. Vytvářením ketoderivátů karotenoidů je *Phaffia* podobná rodu *Cryptococcus*. Liší se od všech ostatních kvasinek schopností zkvašovat sacharidy, i když často velmi slabě, delší dobu a při nízké teplotě. Blastokonidie nevytváří. Zatím zůstává jako samostatný rod, který reprezentuje jediný druh s neurčitým fylogenetickým vztahem. Praktické využití této kvasinky může být v její výživové hodnotě pro různé prvoky, perloočky, ale také kraby a raky [13].

2.5 Kvasinkový růst – kultivace

Kvasinky jsou všudypřítomné mikroorganizmy. Mohou se vyskytovat v půdě, ve vzduchu, mořské vodě, na rostlinách, také jsou obvykle přítomné na zvířatech a v potravinářských výrobcích [10,14].

Životní prostředí představuje pro kvasinky velký zdroj nutričních látek a prostor pro jejich růst a metabolismus. Na druhou stranu kvasinky neustále podstupují nespočetným změnám v podmínkách prostředí. Dané podmínky ovlivňují metabolickou aktivitu, růst a samotné přežití kvasinek. Základní znalosti o vlivu faktorů prostředí jsou důležité v rámci pochopení ekologické a biologické rozmanitosti kvasinek [10,14].

2.5.1 Požadavky kvasinek na růst

Jednobuněčné organizmy potřebují pro svůj růst a normální fungování specifické podmínky. Stav buňky uvnitř je ovlivněn chemickými, fyzikálními a biologickými faktory z prostředí, kde rostou [15].

Porozumění těmto podmínkám a požadavkům kvasinek je důležitou částí úspěšné kultivace v laboratoři nebo také v optimalizovaných průmyslových fermentačních procesech [15].

2.5.2 Fyzikální požadavky

Mikroorganizmy obecně jsou vystaveny velkému množství faktorů z prostředí, jako je teplota, chlad, kyseliny, radiace, tlak a dokonce vliv jiných mikroorganismů [15].

2.5.3 Teplota

Teplota je jedním z nejdůležitějších fyzikálních parametrů, které ovlivňují růst kvasinek. Každý mikroorganismus vykazuje charakteristickou maximální, minimální nebo optimální teplotu pro růst. Podle teplotních růstových oblastí můžeme kvasinky rozdělit na psychotrofní, mezotrofní a termofilní. Většina laboratorních a průmyslových kvasinek jsou mezofily tzn. mohou růst v teplotním rozmezí 20-30 °C [15].

2.5.4 Vodní potenciál

Všechny životní procesy probíhají ve vodě. Živé organizmy potřebují pro svůj růst a metabolismus velkou aktivitu vody. Stejně jako v případě teploty, kvasinky mají své hodnoty pro vodní potenciál (maximální, minimální a optimální). Hodně mikroorganismů žije v hypotonických nebo isotonických podmínkách. Halofily jsou mikroorganizmy, které se nacházejí v prostředí s vysokou koncentrací rozpuštěných látek. Obligátní halofily žijí optimálně v 25% koncentraci rozpuštěných solí, ale pro svůj růst potřebují minimálně 9% koncentraci soli [15].

Fakultativní halofily jsou pozoruhodně rezistentní k solím, i když nežijí v prostředí s vysokou koncentrací rozpuštěných látek. Mikroorganizmy, které jsou odolné vůči vysokému osmotickému tlaku a zároveň dokáží v tomto prostředí růst, se nazývají osmolily [15].

2.5.5 pH prostředí

Většina kvasinek velmi dobře roste mezi hodnotami pH 4,5 až 6,5. Téměř všechny druhy jsou schopné růst i ve více kyselém nebo alkalickém prostředí, i když pomaleji [10, 15].

2.5.6 Kyslík

Vzhledem na kyslíkové požadavky dělíme mikroorganizmy do několika kategorií. *Aeroby* využívají kyslík ve svém metabolismu. Organizmy, které nemohou růst bez kyslíku, se nazývají *obligátní aeroby*. *Fakultativní anaeroby* jsou aeroby, které jsou schopné růst bez přístupu kyslíku. *Mikroaerofily* nemohou růst v normálním atmosférickém prostředí, ale pro svůj metabolismus požadují malé množství kyslíku. *Anaeroby* postrádají metabolické enzymové systémy na využití kyslíku v dýchacím metabolismu. Striktní nebo obligátní anaeroby nemají enzymy na zpracování toxického kyslíku, nemohou proto tolerovat ani volný kyslík v bezprostřední blízkosti, a pokud mu budou vystaveny, zahynou. *Aerotolerantní*

anaeroby nezpracovávají kyslík, ale přežijou a rostou v prostředí, kde je kyslík v omezeném množství [10].

2.5.7 Jiné faktory prostředí

Různé formy elektromagnetického záření (ultrafialové, infračervené, viditelné světlo) proudí neustále ze Slunce na Zem. Kvasinky jsou často zničeny toxickými produkty kyslíku, které vznikají při kontaktu se světlem. Některé mikrobiální druhy produkují karotenoidní pigmenty jako ochranu proti destrukčnímu efektu, který je způsoben absorbováním ultrafialového nebo ionizujícího záření vlivem toxických forem kyslíku [10,15].

2.5.8 Nutriční požadavky

Kvasinky získávají esenciální prvky z prostředí, kde rostou, například z jednoduchých potravinářských zdrojů, kde mají k dispozici makronutrienty, jako jsou C, H, O, N, P, K, Mg a S nebo mikronutrienty, jako jsou stopové prvky. Kvasinky jsou chemoorganotrofní organizmy, které využívají organické komponenty jako zdroj uhlíku a energie. Zdrojem uhlíku mohou být i odpadní potravinářské substráty. Může to být syrovátka, cukrová třtina, sojový olej, kukuřičný sirup a také řepka olejka, jejíž vlastnosti budou podrobněji popsány v následující kapitole [15].

2.6 Odpadní substráty

2.6.1 Odpadní substráty využitelné ke kultivaci kvasinek

Karotenogenní kvasinky rostou v širokém rozmezí pH (2,5-9,5) a taky při teplotách 5-26 °C. Pokud dochází ke stresovým podmínkám, zvyšuje se často také produkce pigmentů [4].

Některé druhy kvasinek, jako například *Rhodotorula* a *Phaffia*, mohou být komerčně využívány pro potravinářství a biotechnologii v syntéze přírodních karotenoidů (β -karoten, torulen, torularhodin a astaxanthin). Limitující je ale cena produkce [4].

Zavedení výroby β -karotenu do průmyslu bude umožněno jen v případě snížení výrobních nákladů. Toho je možné dosáhnout využitím odpadních surovin z průmyslových výroby, jako zdrojů nutričních látek, a následným zvyšováním množství vyprodukovaných pigmentů po optimalizaci kultivačních podmínek [4].

Jako substráty pro růst kvasinek mohou sloužit pentózy a hexózy, také disacharidy, ethanol, methanol, glycerol atd. [16].

2.6.2 Lipidové odpadní substráty

2.6.2.1 Glycerol

Glycerol (1,2,3 - propantriol) je bezbarvá, sladká, viskózní kapalina bez zápachu. Surový glycerol je 70 – 80 % čistý a pomocí vakuové destilace je přečišťován ke komerčnímu použití o koncentraci kolem 95,5 až 99 %. Glycerol je dobře rozpustný v alkoholech a vodě, částečně je rozpustný v mnoha známých rozpouštědlech, jako jsou étery nebo dioxan, ale je nerozpustný v uhlovodících. Čistý glycerol má hustotu $1,261 \text{ g.cm}^{-3}$, teplotu tání při 18,2 °C a teplotu varu 290 °C za normálních atmosférických podmínek. Za nižších teplot glycerol tvoří krystaly. Glycerol je součástí přírodních tuků, ve kterých se vyskytuje ve formě triacylglyceriolů (esterů VMK a glycerolu) [17].

Tab. 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti a obvyklé složení odpadního glycerolu z výroby bionafty [17]

glycerol	55-60 % m/m, min.
voda	8-14 % m/m, max.
síra	100 mg/kg, max.
methanol	6-12 % m/m, max.
fosfor	500 mg/kg, max.
Na+K	10 000 mg/kg, max.
Ca+Mg	5 000 mg/kg max.- mechanické nečistoty
organické látky	25-30 % m/m, max.
hustota p_i 20 °C	1010-1060 kg/m ³
viskozita p_i 40 °C	150-260 mm ² /s
teplota tuhnutí	-15 °C
teplota vzplanutí	10 °C

Glycerol lze použít jako přísadu nebo jako surovinu ve škále odvětví sahající od potravinářského průmyslu, přes průmysl tabákový a farmaceutický až po průmysl chemický - syntéza trinitroglycerinu, alkydových pryskyřic (živic) a polyuretanů. Dnes je možné najít glycerol v léčivech, kosmetice, potravinách, krmivářství, technických průmyslových aplikacích [18].

2.6.2.2 Řepka olejka (*Brassica napus*)

Řepka olejná je ve výrobních podmínkách České republiky hlavní olejinou. Z botanického hlediska řadíme řepku mezi dvouděložné rostliny čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), kam náleží také plodiny jako hořčice (*Sinapis alba*), tuřín (*Brassica napus* L. var. *napobrassica*), vodnice (*Brassica rapa* L. var. *rapa*). Řepkové semeno je získáváno z několika druhů náležejícím k rodu *Cruciferae*. Ten zahrnuje hořčici hnědou (*Brassica juncea*), řepku (*Brassica napus*) a řepici (*Brassica campestris*) [19, 20].

Plody řepky jsou úzké a dlouhé asi 4 cm. Každá tobolek obsahuje od 15 do 40 malých kulatých semen v závislosti na odrůdě a podmínkách pěstování. Semeno řepky je složeno z osemení, endospermu a klíčku. Jeho barva je v závislosti na zralosti modročerná až černá. Semeno u řepky ozimé je poněkud větší než u řepky jarní [20].

Tab. 2 Chemické složení neporušeného a loupaného řepkového semene v řepkovém extrahovaném šrotu a v řepkových výliscích [21].

Chemické složení (g/kg sušiny)	Řepkové semeno	Řepkové výlisky		Řepkové semeno	ŘEŠ	
		intaktní	loupané		Intaktní	loupaný
Organická hmota	960	932	927	961	923	918
Dusíkaté	181	321	326	198	396	424

látky						
Tuk	965	120	128	495	21	21
Vláknina	66	102	61	64	117	72
NDF	157	253	151	164	286	193
ADF	145	197	120	144	209	135
Lignin	90	80	73	60	88	44
Cukry	52	112	135	49	105	120

NDF - neutro-detergentní vláknina. Její hodnota zahrnuje všechny složky buněčné stěny, tedy hemicelulózu, celulózu, lignin a popel.

ADF - acido-detergentní vláknina. Charakterizuje obsah ligninu, celulózy a popele v buněčné stěně. V podstatě se jedná o modifikaci hrubé vlákniny.

ŘEŠ - řepkový extrahovaný šrot [21].

Největší rozdíl mezi řepkovým extrahovaným šrotem a řepkovými výlisky je v obsahu dusíkatých látek a tuku. ŘEŠ (řepkový extrahovaný šrot) má o více než 20 % vyšší obsah dusíkatých látek, o více než 80 % méně tuků než řepkové výlisky. V porovnání s plnotučným řepkovým semenem mají ŘEŠ a řepkové výlisky vyšší obsah dusíkatých látek a nižší obsah energie [21].

Aminokyselinovým složením se řepkové produkty dají úspěšně srovnávat s plnotučnými sójovými boby. Ačkoli sója obsahuje více lysinu než řepka, obsah sirných aminokyselin je u řepkového semene vyšší [20,21].

Plnotučné řepkové semeno hodnotíme jako zdroj energie i bílkovin. Vysoký obsah tuku v semeni řepky omezuje jeho použití do krmných dávek přežvýkavců. ŘEŠ považujeme za vysokoproteinové krmivo. Ve srovnání s jinými olejninami a extrahovanými šroty je použití ovlivněno také obsahem aminokyselin, mastných kyselin a zdánlivou stravitelností [20,21].

Oproti plnotučné sóji je řepkové semeno výrazně bohatším zdrojem mastných kyselin. Je také zdrojem mono i polynenasycených mastných kyselin [20,21].

2.7 Analýza sledovaných kvasinkových metabolitů

2.7.1 HPLC/PDA

Chromatografie je separační metoda, během které se oddělují složky, které jsou ve vzorku. Tato metoda je určena především pro kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorků. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, kdežto mobilní je pohyblivá. Vzorek umísťujeme na začátek stacionární fáze. Mobilní fáze unáší vzorek přes fázi stacionární. Složky ve vzorku mohou být zachyceny stacionární fází, proto se při pohybu zdržují. Nejvíce se zadrží složky, které jsou pomocí stacionární fáze poutány nejsilněji. Nejméně do kontaktu se stacionární fází přicházejí složky nejslaběji poutané. Takto se postupně složky od sebe separují [22,23].

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. V porovnání s plynovou chromatografií o separaci složek rozhodují vzorky nejen vzájemným působením se stacionární fází, ale také velmi výrazně použitá mobilní fáze. Klasické kolonové provedení nemá potřebnou účinnost, ale stalo se základem vysokoúčinné kapalinové chromatografie – HPLC. Aby separace byla účinná, je potřeba použít dostatečné množství malých zrníček sorbentu, které dávají velký odpor protékající kapalině. Proto je potřeba pracovat za podmínek zvýšeného tlaku [22,23].

Mezi výhody této metody patří práce s menším množstvím analyzovaného vzorku, kratší doba separace a taky možnost práce s termolabilními látkami pevného a kapalného skupenství.

Kontinuální dělení látek mezi stacionární a mobilní fází probíhá v krátkých náplňových kolonách o délce 15-30 cm. Vyrobené jsou z oceli pro vysoké tlaky kolem 50 MPa. Na dávkování vzorku se používají buď dávkovací kohouty anebo nastřikávání roztoku pomocí injekční stříkačky [22,23].

2.7.2 Hmotnostní spektroskopie MS

Základní charakteristikou, která definuje makromolekuly i nízkomolekulární látky, je jejich molekulová hmotnost. Na její analýzu bylo vyvinuto hodně metod, jako například kapilární a gelová elektroforéza, hmotnostní spektrometrie a měření rozptylu světla. Metoda hmotnostní spektrometrie se liší od jiných metod velkou přesností a rychlostí stanovení a také vysokou citlivostí. Tato metoda je fyzikálně-chemická a slouží k určení hmotností atomů, molekul a jejich částí, které se převádí na kladné nebo záporné ionty. Částice bez nábojů nejsou zaznamenány, ani nejsou zpracovány. Naopak nabitě částice jsou separované v analyzátoru dle poměru hmotnosti k náboji (m/z) a potom jsou zaznamenány v detektoru. Při kvantitativní analýze se měří počet určitých iontů (plocha anebo výška jejich píků). Záznam četnosti výskytu jednotlivých iontů se pak nazývá hmotnostní spektrum [24].

Obecně hmotnostní spektrometrie se považuje za destruktivní analytickou metodu. Skládá se ze základních částí: iontový zdroj, ve kterém dochází k ionizaci, analyzátor, ve kterém jsou ionty rozdělené v závislosti na poměru m/z , detektor, datový systém pro sběr dat a řízení analýzy, čerpací systém, většinou dvoustupňový a vakuový systém, který zabezpečuje udržování vysokého vakua potřebného pro hmotnostní spektrometrii [25].

Primární systém je zabezpečený mechanickými rotačními pumpami, sekundární dočerpání na pracovní tlak je zajištěné difúzními nebo turbomolekulárními pumpami.

Hlavní využití hmotnostní spektrometrie v analytice počívá ve stopové analýze organických látek se zaměřením na zjištění nebo potvrzení jejich struktury [26].

2.7.3 Praktické využití HPLC ve spojení s MS

Spojení kapalinové chromatografie, metody s vysokou separační schopností, s hmotnostní spektrometrií, která je vysoce citlivá identifikační metoda, přináší důležité výhody pro analýzu organických látek [24].

Tato technika se začala aktivně používat zejména v posledních letech. Právě tehdy byl vyřešen základní problém s tlakem a objemem mobilní fáze v místě jejího smísení. Iontové zdroje mohou pracovat za vysokého tlaku a na výstupu je tlak přibližně atmosférický. Tato neshodnost obojích zařízení byla vyřešená pomocí ionizačních technik, které jsou schopné transformovat kapalnou mobilní fází do aerosolu za atmosférického tlaku. Prvotním požadavkem pro spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním spektrometrem bylo odstranění složek mobilní fáze před samotnou ionizací [27].

V dnešní době se výlučně používají sprejové ionizační techniky, které jsou konstrukčně vybavené tak, aby mohly odvést největší množství prchavých složek z kapalně mobilní fáze dříve, než se budou moct dostat do hmotnostního analyzátoru. Ve spojení LC/MS je významným analyzátozem iontová past. Daný typ analyzátoru je vhodný hlavně pro analýzu stopového množství vzorku [24,27].

Zvolená chromatografická kolona se řídí zejména požadavky na danou separaci látek. Nejčastěji se používá reverzní chromatografie s kolonami typu C8 a C18. V praxi jsou nejvíce používané kratší kolony s menším vnitřním průměrem a drobnou stacionární fází, kde je aplikován průtok mobilní fáze v řádech desetin ml/min. Díky tomu je možné celý objem mobilní fáze převádět přímo do iontového zdroje [27].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo otestovat možnost využití řepkových výlisků jakožto odpadů po výrobě řepkového oleje jako nutričního zdroje pro kultivaci karotenogenních kvasinek a produkci vybraných metabolitů. Za tímto účelem byly řešeny následující dílčí úkoly:

- Testování a optimalizace kultivačních podmínek pro kultivaci karotenogenních kvasinek s využitím odpadních řepkových substrátů v různém uspořádání.
- Vyhodnocení růstu a výtěžku vybraných kvasinkových metabolitů na řepkových výliscích, srovnání s jinými typy substrátů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály a chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité ke kultivaci kvasinek

Kvasničný autolyzát - Himédia (India)
D-glukóza monohydrát p.a. – Lach-Ner s. r.o. (ČR)
Síran amonný p.a. - Lachema (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. - Lachema (ČR)
Síran horečnatý heptahydrát p.a. - Chemapol (ČR)
Chlorid sodný p.a. - Lachema (ČR)

4.1.2 Chemikálie použité pro izolaci karotenoidů

Aceton p.a. - Lachema (ČR)
Hydroxid draselný p.a. - Lachema (ČR)
Diethylether p.a. - Lachema (ČR)
Ethanol pro UV-VIS - Lachema (ČR)

4.1.3 Chemikálie použité pro HPLC stanovení

Methanol pro HPLC Gradient Grade, Sigma - Aldrich (SRN)
Ethanol pro HPLC Gradient Grade, Sigma - Aldrich (SRN)

4.2 Přístroje a pomůcky

4.2.1 Přístroje a pomůcky použité při kultivaci kvasinek

Spektrofotometer VIS, Helios δ - Unicam (UK)
Mikroskop L II ooA - Intraco Micro (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera - GKB Color Digital (Taiwan)
Lucia Image active 5.0 - Laboratory Imaging spol. s r.o. (ČR)
Třepačka IKA Yellow Line, (SRN) - Yellow Line (SRN)
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen - Laborzentrifugen (SRN)
Analytické váhy Boeco (SRN) - Boeco (SRN)

4.2.2 Použité přístroje a pomůcky k izolaci a stanovení karotenoidů

Filtry pro HPLC, PRE-CUT - Alltech (GB)
Vakuová odparka RV 06 - IKA (SRN)
Vodní lázeň EL-20 - Merci a.s. (ČR)
Soustava HPLC/MS (Thermo Fisher Scientific, USA)
Programátor gradientu GR 5 - ECOM spol. s r.o. (ČR)
Vysokotlaké čerpadlo typ P 4020 - ECOM spol. s r.o. (ČR)
Dávkovací ventil typ C - ECOM spol. s r.o. (ČR)
Termostat kolony typ LCO 101 - ECOM spol. s r.o. (ČR)
Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
Software Xcalibur – chromatography SW
Kolona Kinetex C18, 2,6 μm, 4,6 x 150 mm - Phenomenex
Držák předkolony - KJO – 4282 – Supelco

4.2.3 Kvasinkovité kmeny

Rhodotorula glutinis CCY 20-2-33

Sporobolomyces roseus CCY 19-6-4

Cystofilobasidium capitatum CCY 10-1-1

Cystofilobasidium capitatum CCY 10-1-2

4.2.4 Složky kultivačních médií

Jako substrát pro kultivaci kvasinek byl použit odpad po výrobě jedlého řepkového oleje – řepkové výlisky dvou typů se zbytkovým obsahem oleje 2,55 % a 9 %. Výlisky byly získány od lokálního výrobce oleje Agropodnik Jihlava, a.s.

4.3 Postupy práce

4.3.1 Kultivace mikroorganismů

4.3.1.1 Kultivace karotenogenních kmenů

Kvasinky rodů *Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* jsou mezofilní aerobní mikroorganismy s podobnými podmínkami růstu. Kvasinky byly kultivovány v tekutém médiu při teplotě 28 °C za neustalého třepání a osvětlení potřebného pro produkci karotenoidů. Před zaočkováním byla média sterilovaná v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut.

4.3.1.2 Inokulum I

Pro každou sérii kultivací bylo nejdříve připraveno inokulum I tak, aby poměr ino I : ino II byl 1:5. Složení inokula I, použitého při kultivacích je uvedeno v tab. 3. Do každého vysterilovaného inokula I ve sterilním prostředí byly naočkovány 3 kličky zásobní kultury na Petriho miskách. Kultivace probíhala 24 hodin.

Tab. 3 Složení inokula I

Složka	Množství (g)
Glukóza	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
KH ₂ PO ₄	5
MgSO ₄	0,3
Kvasničný autolýzát	7
Vodovodní voda	1 000 ml

4.3.1.3 Inokulum II

Pro každé inokulum I bylo připraveno příslušné inokulum II podle určité kultivační série tak, aby poměr ino I: ino II byl 1:5. Kultury z inokula I byly sterilně přelity do inokula II a kultivovány dalších 24 hodin. Inokulum II bylo základem pro následující sérii kultivací v produkčních médiích. Všechna inokula II obsahovala stejný základ uvedený v tab.4.

Tab. 4 Složení inokul II – základ

Složka	Množství (g)
Glukóza	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	5

KH ₂ PO ₄	5
MgSO ₄	0,34
Vodovodní voda	1000 ml

4.3.1.4 Produkční média

Pro každou sérii inokul II byla připravena různá produkční média o potřebném objemu. Produkční média obsahovala stejný základ, který je uveden v tabulce 5. Odlišnosti, kterými se jednotlivá média lišila, jsou uvedena v tabulce 6. Inokula II byla sterilně rozlita do produkčních médií tak, aby poměr ino II : produkční médium byl 1:5. Kultury byly kultivovány 96 hodin.

Tab. 5 Složení produkčního média - základ

Složka	Množství
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄	0,34 g
Vodovodní voda	1000 ml

Tab. 6 Složení produkčních médií (poměry)

Označení	Složení
kontrola	Základ + Glukóza 30 g/l
75 glu + 25 ř1	Základ + Glukóza 22,5 g/l + řepka1 7,5 g/l
50 glu + 50 ř1	Základ + Glukóza 15 g/l + řepka1 15g/l
25 glu + 75 ř1	Základ + Glukóza 7,5 g/l + řepka1 22,5 g/l
100 ř1	Základ + řepka 1 30g/l
75 glu + 25 ř2	Základ + Glukóza 22,5 g/l + řepka2 7,5 g/l
50 glu + 50 ř2	Základ + Glukóza 15 g/l + řepka2 15g/l
25 glu + 75 ř2	Základ + Glukóza 7,5 g/l + řepka2 22,5 g/l
100 ř2	Základ + řepka2 30g/l

Pro stanovení růstových charakteristik jednotlivých kmenů se složení produkčního média lišilo od základního jen tím, že místo glukózy bylo přidáno stejné množství řepky. Jako řepka 1 byly použity výlisky s deklarovaným obsahem lipidů 2,55 %, jako řepka 2 výlisky s obsahem lipidů 9 %.

Pro klasickou kultivaci obsahovalo produkční médium jak řepku, tak glukózu, a to v určitých procentualních poměrech, které jsou znázorněné v tab. 6.

4.3.1.5 Stanovení redukujících sacharidů metodou Somogyiho-Nelsona

Redukující sacharidy v produkčních médiích hydrolyzovaných pomocí enzymů, jakož i samotných enzymových preparátů, byly stanovené spektrofotometricky metodou Somogyiho-Nelsona. Tato metoda využívá schopnosti redukujících sacharidů vyredukovat z alkalického prostředí měďnatých solí oxid měďný, který s arzenomolybdenanovým činidlem poskytuje barevný komplex, toto zabarvení se přeměří spektrofotometricky.

Nejprve byla připravena činidla:

Roztok I

24 g bezvodého Na_2CO_3 , 16 g NaHCO_3 , 144 g bezvodého Na_2SO_4 , 12 g vinanu sodno-draselného a 800 ml destilované vody.

Roztok II

4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 24 g bezvodého Na_2SO_4 a 200 ml destilované vody.

Roztok III

25 g molybdenanu amonného rozpuštěného v 450 ml destilované vody, 21 ml koncentrované H_2SO_4 a 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rozpuštěného v 25 ml destilované vody. Tento roztok se musel nechat 48 hodin stát při laboratorní teplotě za nepřístupu světla.

V samotném stanovení se k 1 ml vzorku přidalo 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II. Zkumavky se umístily na vroucí vodní lázeň na 10 minut. Potom se ochladily vodou, přidalo se 0,5 ml roztoku III, dobře promíchalo, aby se vzniklý Cu_2O rozpustil, a doplnilo se destilovanou vodou na celkový objem 10 ml. Změřila se absorbance při 720 nm.

4.3.1.6 Stanovení zákalu turbidimetry

1 ml vzorku byl naředěný destilovanou vodou tak, aby se nepřekročil rozsah spektrofotometru. Byla změřená absorbance při vlnové délce 630 nm proti destilované vodě. V případě živných médií obsahujících přísady odpadního substrátu se jako blank používalo toto médium.

4.3.1.7 Zpracování biomasy

Celý objem produkčního média byl centrifugovaný při 5 000 otáčkách po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Potom byly buňky promyté destilovanou vodou a opět stočené. Nakonec byla biomasa rozsuspendovaná ve fyziologickém roztoku a uložena v mrazničce.

Biomasa kultivovaná v produkčních médiích s obsahem odpadního substrátu byla před centrifugací ještě přefiltrována přes několikrát složenou gázu, aby se buňky oddělily od přidaného nerozpuštěného odpadu.

4.3.1.8 Růstová křivka

Růstová křivka byla provedena u kvasinek rodů *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus*, *Cystofilobasidium capitatum CCY 10-1-1* a *Cystofilobasidium capitatum CCY 10-1-2*.

Růstová křivka u kvasinek byla stanovovaná v předem určených časových intervalech vždy stejným způsobem. Pro každý plánovaný odběr byla ze stejného inokula II zaočkována jedna produkční Erlenmayerova baňka o objemu 500 ml se 150 ml produkčního média. 1 ml suspenze byl použitý ke stanovení zákalu a mikroskopickému pozorování na vyloučení kontaminace, 10 ml na stanovení hmotnosti sušiny a 100 ml pro stanovení karotenoidů a ergosterolu metodou HPLC. Získané údaje byly poté zpracované v programu Excel 2010.

4.3.1.9 Stanovení sušiny gravimetricky

10 ml kultury z růstové křivky, která byla určena pro stanovení sušiny, bylo zcentrifugováno při 5 000 otáčkách po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Buňky byly následně promyté destilovanou vodou a opět stočené. Vzorek byl rozsuspendovaný v 1 ml destilované vody, nalitý do předem vysušené a zvážené váženky a vysušený do konstantní hmotnosti při teplotě 105 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu v exikátoru a zvážení

na analytických vahách, byla z rozdílu hmotnosti prázdné váženky a váženky s vysušeným vzorkem stanovena hmotnost sušiny v každém vzorku.

4.3.2 Izolace a analýza karotenoidů

Karotenoidy i ergosterol jsou součástí lipidické frakce kvasinkových buněk, proto je možné izolovat je několikastupňovou extrakcí spojenou se zmýdlněním. K analýze byly použity vzorky z produkčních médií o obsahu 100 ml. Identifikace byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s PDA detekcí.

4.3.2.1 Izolace karotenoidů zmýdlněním

Uložené vzorky z mrazničky byly rozmražené ve tmě a stočené při 5 000 otáčkách po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byly promyté destilovanou vodou a opět stočené. Sediment, který obsahoval kvasinkové buňky, byl v třecí misce dezintegrován s 50 ml acetonu, kvantitativně převedený na odpařovací misku a po přidavku 50 ml 10% alkoholického roztoku KOH byl zmydlován na vodní lázni při 90 °C po dobu 30 minut.

4.3.2.2 Extrakce

Zmýdlený odparek byl třikrát extrahován pomocí diethyletheru. Spojené etherové frakce byly odpařené na vakuové odparce.

4.3.2.3 Analýza karotenoidů metodou HPLC/PDA

Vysušený extrakt byl rozpuštěn v ethanolu pro HPLC, přefiltrován přes jednorázový filtr a převeden do mikrocentrifugační zkumavky. Před samotnou analýzou byly vzorky ještě krátce stočené při 5 000 ot/min.

K chromatografické analýze karotenoidů byla použita sestava HPLC od firmy Thermo Fisher Scientific, USA. Ke zpracování analytických dat a chromatogramů byl použit chromatografický software Xcalibur.

4.3.2.4 Podmínky separace

Analýza karotenoidů a ergosterolu metodou HPLC probíhala za izokratických podmínek při průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min a teplotě 45 °C na nerezové koloně s předřazenou předkolonou, s fotometrickou detekcí při vlnové délce odpovídající maximu absorpce příslušné analyzované látky (450 nm pro karotenoidy a 285 nm pro ergosterol). Vzorek byl na kolonu dávkován ventilem s dávkovací smyčkou o objemu 20 µl. Jako mobilní fáze byl použit methanol pro HPLC.

4.3.2.5 Identifikace a kvantifikace karotenoidů

Analýza byla provedena na základě chromatografické analýzy standardů karotenoidů a ergosterolu při daných vlnových délkách. Stanovení množství vybraných karotenoidů a ergosterolu bylo stanoveno pomocí kalibrace metodou kalibrační křivky. Ke kvantitativnímu vyhodnocení byla použita závislost plochy píků jednotlivých standardů na koncentraci. Byly použité standardy v koncentračním rozmezí β-karoten 10-100 µl/ml, lykopen 10-100 µl /ml a ergosterol 0,1-1 mg/ml. Ke zpracování analytických dat a chromatogramů byl použit chromatografický software Xcalibur.

5 VÝSLEDKY

5.1 Růstová charakteristika

Stanovení růstových charakteristik určitých mikroorganismů je důležité pro analýzu vybraných metabolitů a také pro pochopení fyziologie kmenů kvasinek, které zkoumáme. Růstová křivka vyjadřuje závislost nárůstu biomasy na čase. Růstové charakteristiky byly provedeny u všech výše zvolených kmenů kvasinek. Pro rychlejší stanovení množství sušiny v jednotlivých vzorcích byla sestavena kalibrační křivka, která vyjadřuje závislost množství sušiny na zákalu různě koncentrovaných roztoků kvasinek.

5.1.1 Kalibrační závislost biomasy a zákalu

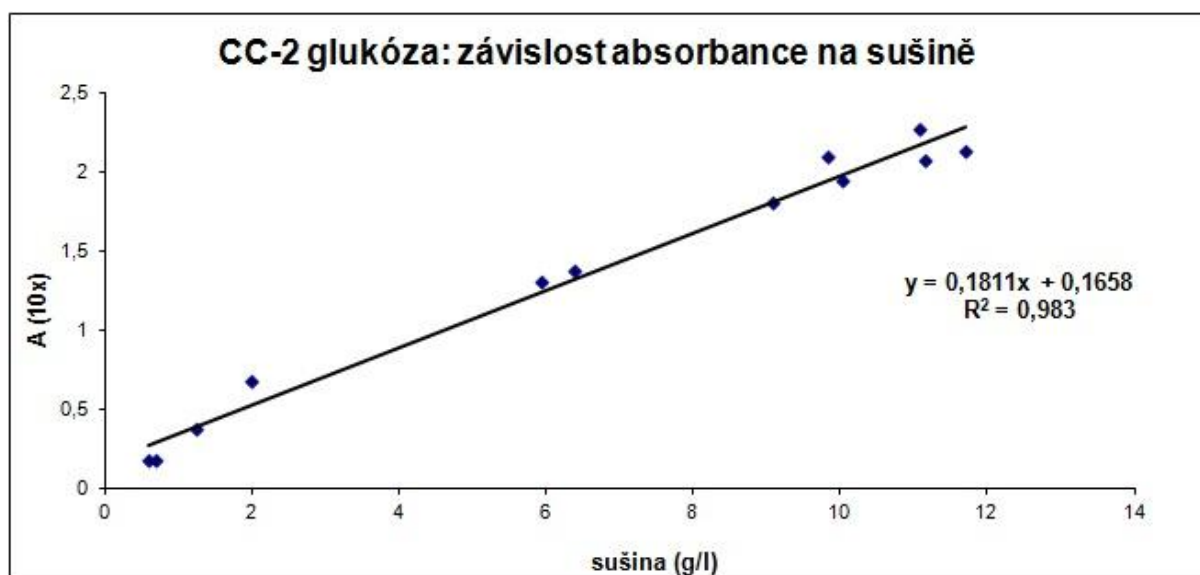
Kultivace kvasinek a postup stanovení kalibrační závislosti už byl popsán v kapitole 4.3.1.8. Kalibrační křivka spolu s regresní rovnicí jsou uvedené v grafu 1. Pomocí těchto regresních rovnic bylo vyjádřeno množství vyprodukované sušiny jednotlivých kmenů.

5.1.1.1 Růstová křivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 (kultivace na glukóze)

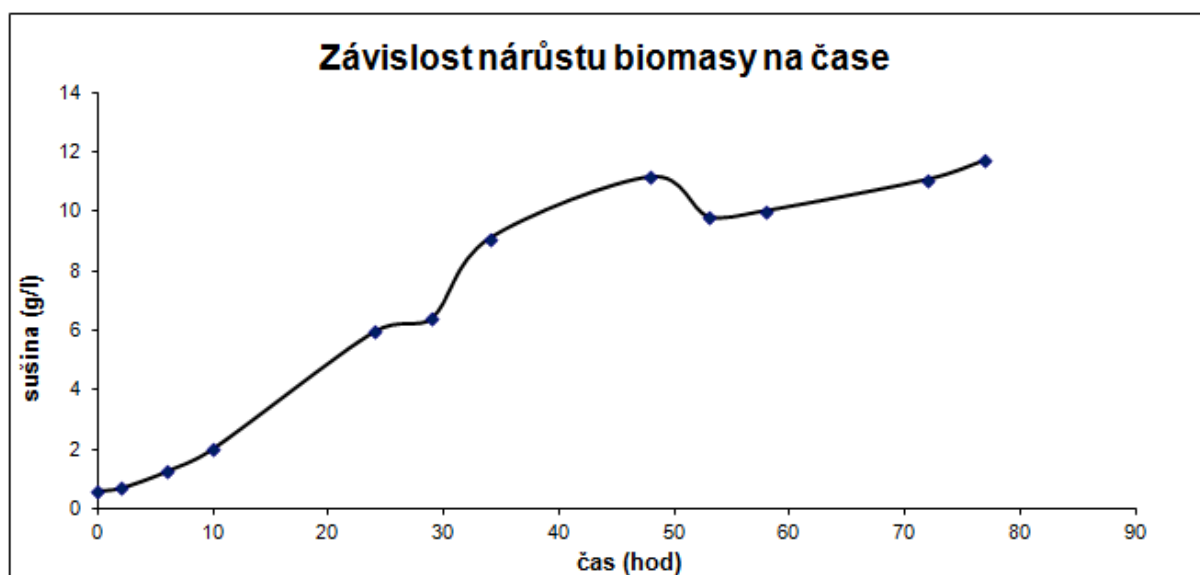
Tab. 7 Hodnoty absorbance a sušiny v závislosti na době kultivace u *C. capitatum* (10-1-2)

hod	A (*10)	Sušina (g/l)
0	0,184	0,60
2	0,180	0,69
6	0,378	1,24
10	0,680	2,0
24	1,312	5,94
29	1,372	6,39
34	1,804	9,08
48	2,070	11,16
53	2,100	9,83
58	1,944	10,02
72	2,270	11,07
77	2,134	11,71
82	1,930	-
96	2,042	-
101	2,088	-

Graf 1 Kalibrační křivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 (glukóza)



Graf 2 Závislost nárůstu biomasy na době kultivace *C. capitatum* (10-1-2)



Výše jsou znázorněné růstové křivky kmene *C. capitatum* (10-1-2), který byl kultivovaný na glukóze, jako hlavní složce produkčního média (Graf 2). Ze závislosti biomasy na čase kultivace můžeme pozorovat dvě maxima. První bylo v 35. hodině a druhé v 50. hodině. Během těchto 15 hodin se růst mírně zpomalil, ale pokračoval dále exponenciálně až k dosažení druhého maxima.

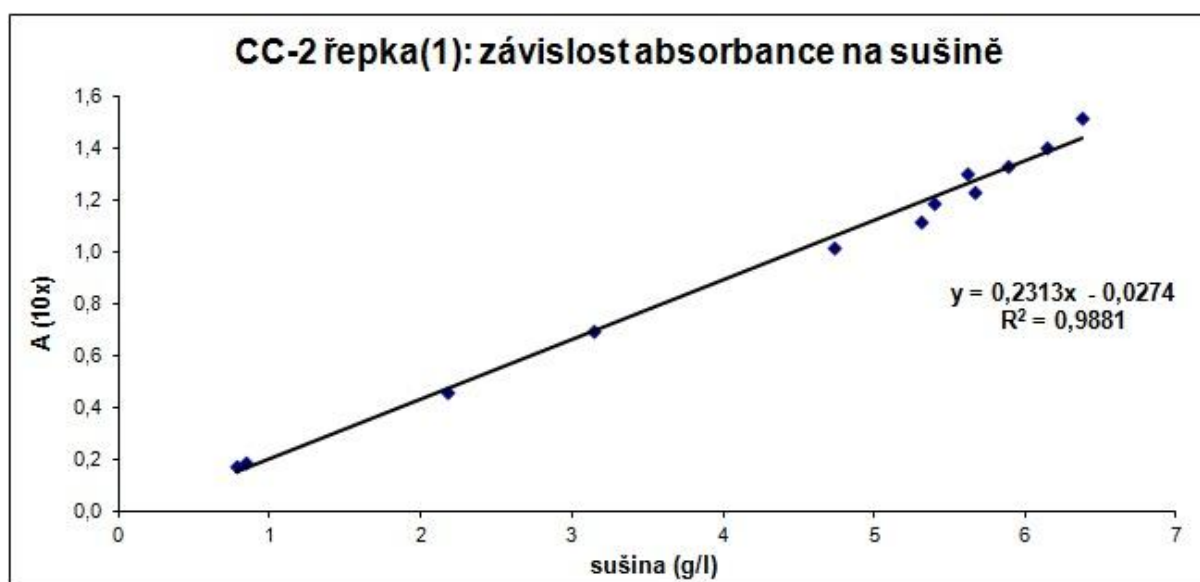
5.1.1.2 Růstová křivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 (kultivace na řepce)

Tab. 8 Hodnoty absorbance a sušiny v závislosti na době kultivace u *C. capitatum*(10-1-2)

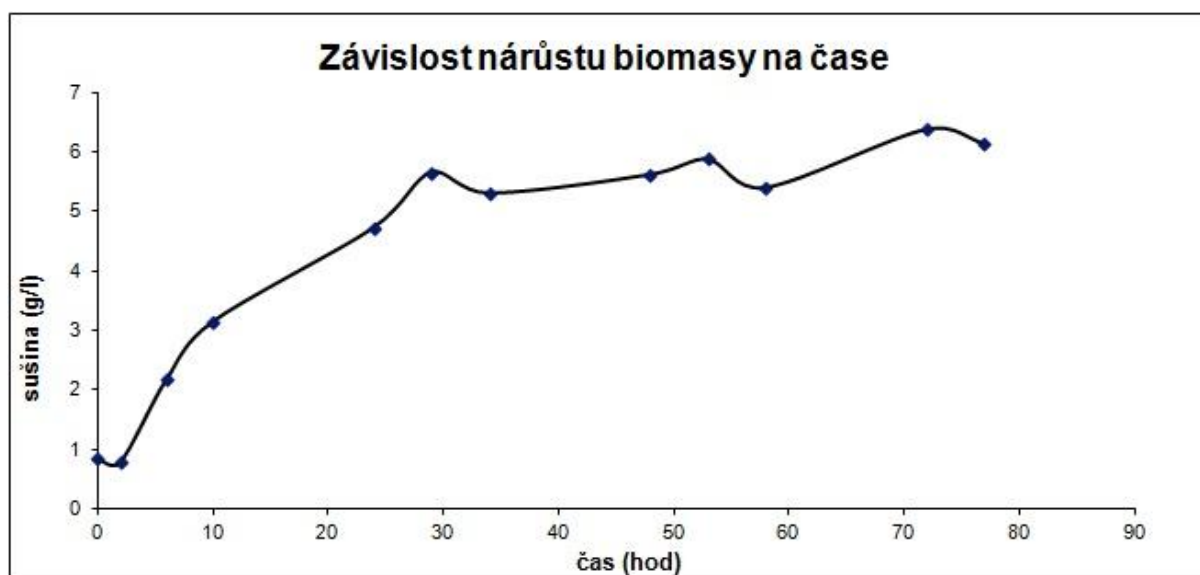
hod	A (*10)	Sušina (g/l)
0	0,190	0,84
2	0,174	0,78
6	0,456	2,17

10	0,694	3,14
24	1,018	4,73
29	1,234	5,66
34	1,120	5,31
48	1,300	5,62
53	1,328	5,88
58	1,186	5,40
72	1,516	6,38
77	1,400	6,14
82	1,508	-
96	1,306	-
101	1,518	-

Graf 3 Kalibrační křivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 (řepka - 1)



Graf 4 Závislost nárůstu biomasy na době kultivace *C. capitatum* (10-1-2)



Z grafů 3 a 4 je vidět, že růstová křivka *Cystofilobasidium capitatum* (10-1-2) vykazuje dvoustupňový nárůst, což je typické pro karotenogenní kvasinky.

První mírné maximum se nachází kolem 50. hodiny. Tady karotenogenní kvasinky přichází do mírně zpomaleného růstu, ale pak zase pokračuje růst v poslední části exponenciální fáze. Pak druhé maximum je kolem 80. hodiny a růst následně přechází do stacionární fáze.

Když porovnáme grafy 2 a 4, tak je jasně vidět, že růstové křivky *Cystofilobasidium capitatum* (10-1-2) na řepce 1 a na glukóze jsou téměř totožné a mají přibližně stejný tvar. Mají stejné hodnoty maxim, to znamená, že kmen vykazuje podobné růstové schopnosti na obou substrátech.

5.1.1.3 Růstová křivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 (kultivace na glukóze)

Růstová charakteristika karotenogenní kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1, kde hlavní složkou produkčního média byla glukóza, byla provedena v předchozích pracích [3].

Rovnice lineární regrese byla:

$$y = 0,1669x + 0,1884$$

$$R^2 = 0,9897$$

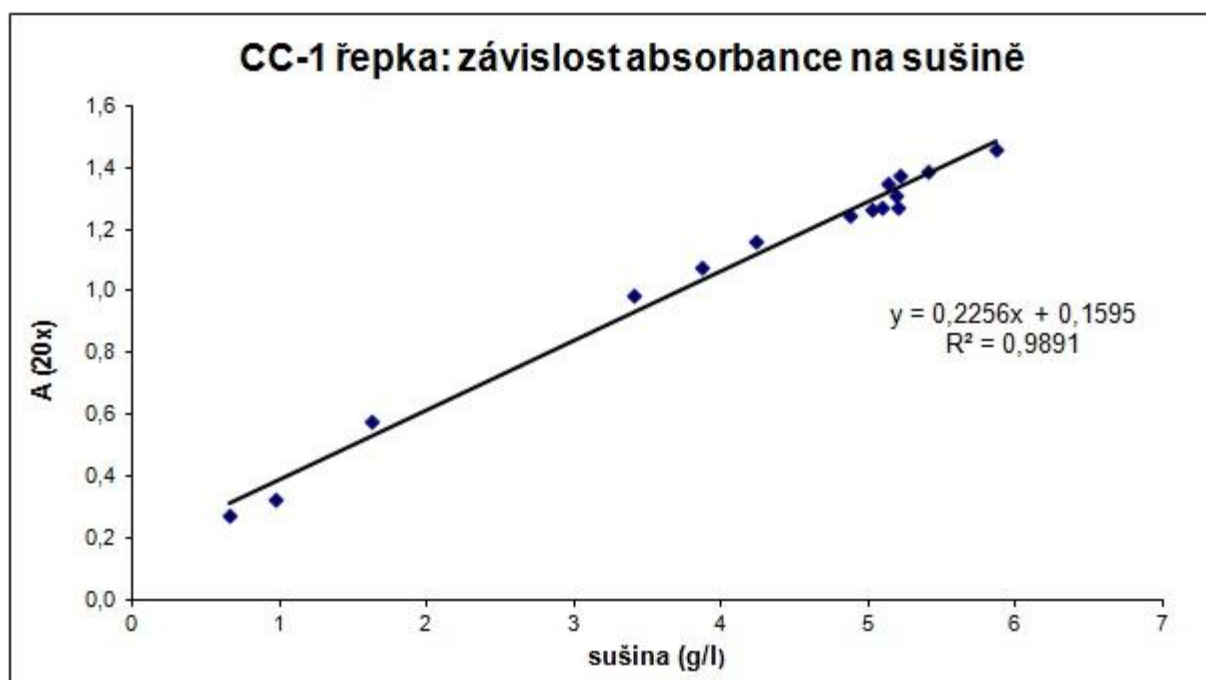
5.1.1.4 Růstová křivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 (kultivace na řepce)

Tab. 9 Hodnoty absorbanci a sušiny v závislosti na době kultivaci u *C. capitatum* (10-1-1)

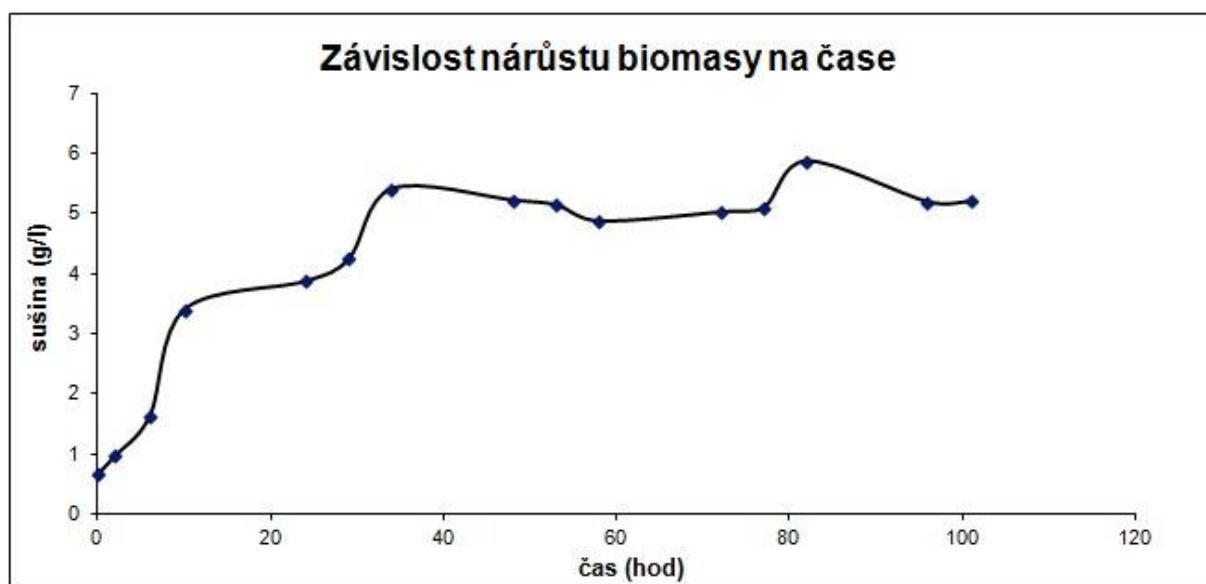
hod	A (*10)	Sušina (g/l)
0	0,274	0,66
2	0,326	0,97
6	0,576	1,63
10	0,984	3,40
24	1,074	3,87
29	1,160	4,24
34	1,390	5,41

48	1,374	5,22
53	1,348	5,14
58	1,246	4,87
72	1,262	5,02
77	1,274	5,10
82	1,460	5,87
96	1,310	5,19
101	1,272	5,20

Graf 5 Kalibrační křivka kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* (10-1-1)



Graf 6 Závislost nárůstu biomasy na době kultivace *C. capitatum* (10-1-1)



Cystofilobasidium capitatum (10-1-1) na řepce roste podobně, jako na glukóze [3]. První mírné maximum se nachází kolem 10. hodiny. Pak následuje zpomalený exponenciální růst, končící druhým maximem v 35. hodině (Graf 6).

Při porovnání růstových vlastností obou kmenů *Cystofilobasidium capitatum* můžeme s jistotou říct, že kmen CCY 10-1-2 vykazuje vyšší produkci sušiny v čase, než kmen CCY 10-1-1, a to jak na glukóze, tak i na odpadním substrátu. Na glukóze je růst o něco rychlejší.

5.1.1.5 Růstová křivka kvasinky *Rhodotorula glutinis* (kultivace na glukóze)

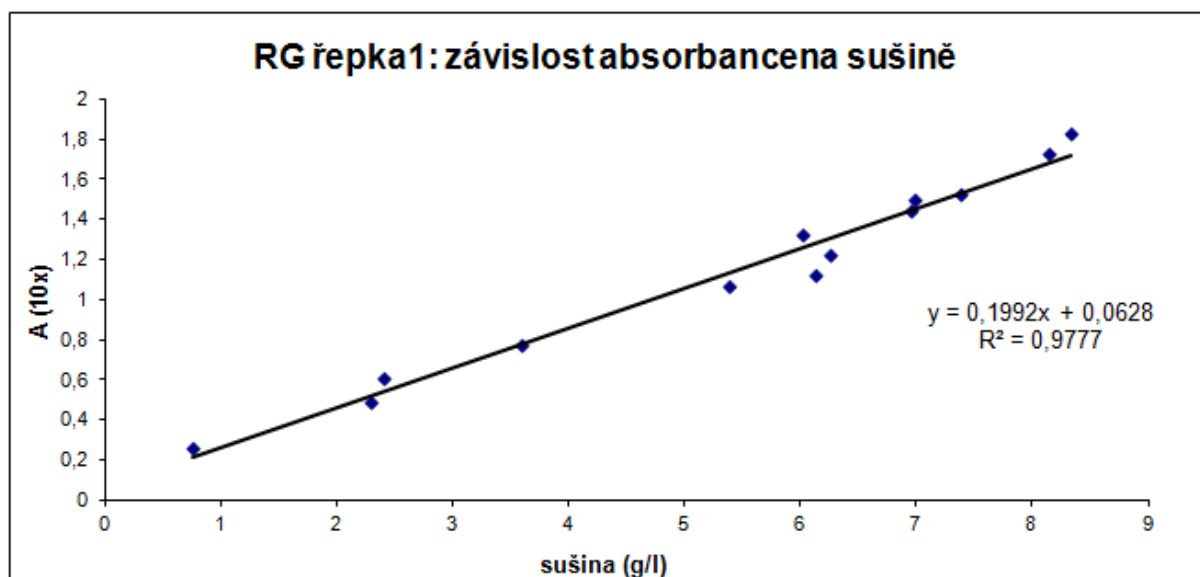
Růstová charakteristika karotenogenní kvasinky *Rhodotorula glutinis*, kde zdrojem uhlíku u produkčního média byla glukóza, byla provedena v předchozích pracích [28].

5.1.1.6 Růstová křivka kvasinky *Rhodotorula glutinis* (kultivace na řepce)

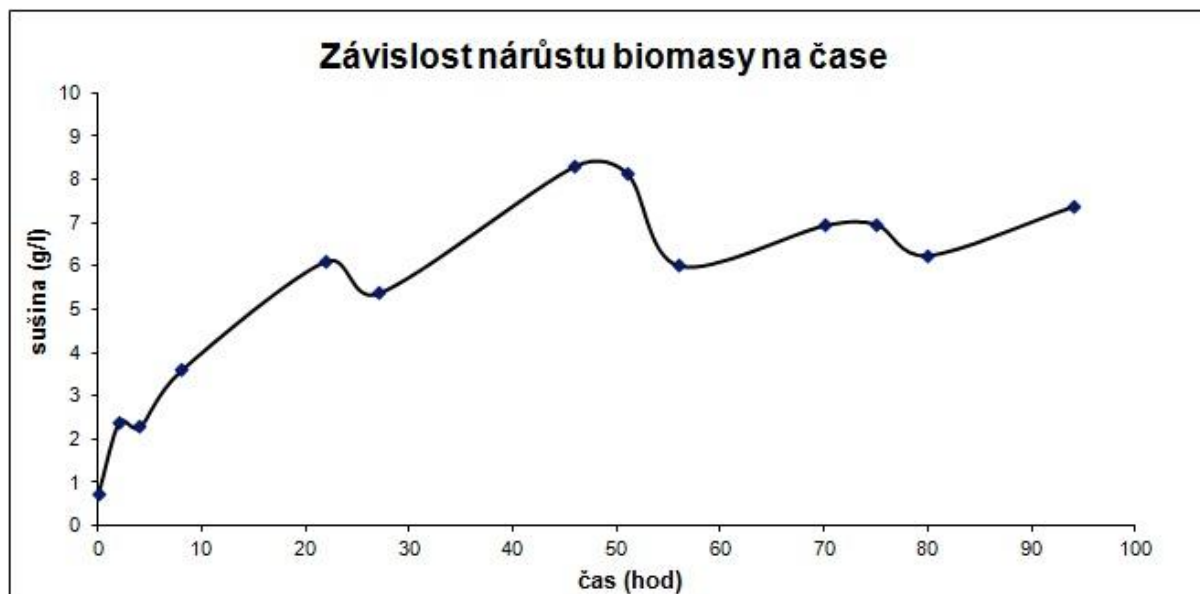
Tab. 10 Hodnoty absorbance a sušiny v závislosti na době kultivace u *Rhodotorula glutinis*

hod	A (*10)	Sušina (g/l)
0	0,264	0,76
2	0,608	2,4
4	0,486	2,29
8	0,770	3,6
22	1,126	6,13
27	1,070	5,38
46	1,826	8,33
51	1,728	8,15
56	1,324	6,02
70	1,440	6,95
75	1,498	6,98
80	1,222	6,26
94	1,528	7,39

Graf 7 Kalibrační křivka kvasinky *Rhodotorula glutinis*



Graf 8 Závislost nárůstu biomasy na době kultivace *R. glutinis* – řepka 1



V této kapitole je uvedena růstová křivka kmene *Rhodotorula glutinis*, kultivace probíhala na odpadním substrátu – řepkových výliscích typu 1 s nižším obsahem oleje. Z grafu 8 je možné pozorovat dva stupně růstu. První maximum je ve 20. hodině a potom pokračuje exponenciální růst. Druhé maximum je kolem 45. hodiny, po které růst přechází do stacionární fáze.

5.1.1.7 Růstová křivka kvasinky *Sporobolomyces roseus* (kultivace na glukóze)

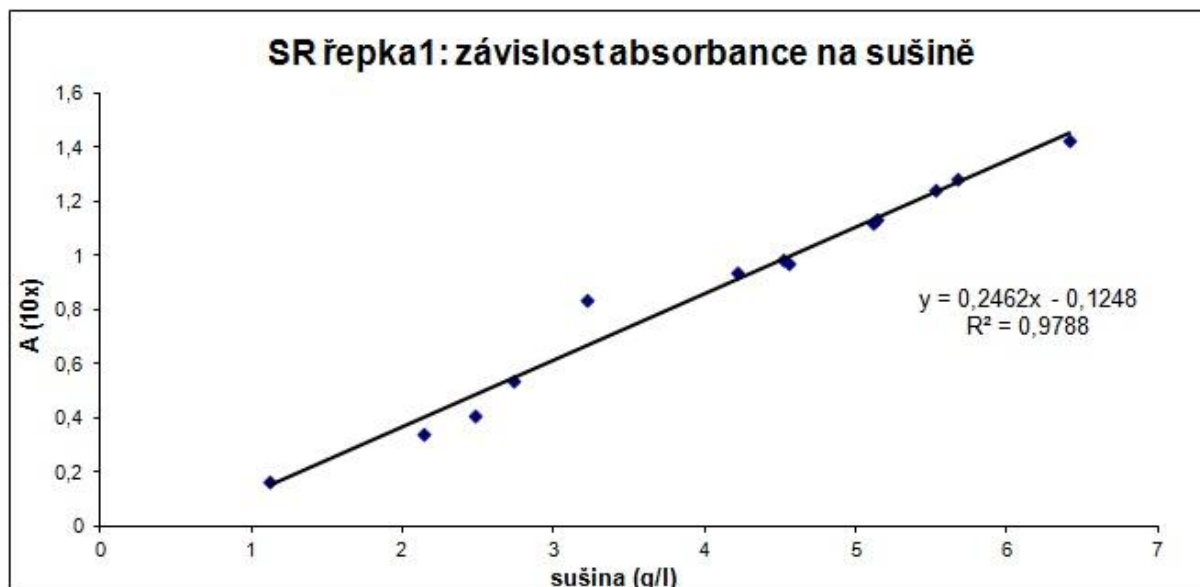
Růstová charakteristika karotenogenní kvasinky *Sporobolomyces roseus*, kde hlavní složkou produkčního média byla glukóza, byla provedena v předchozích pracích [28].

5.1.1.8 Růstová křivka kvasinky *Sporobolomyces roseus* (kultivace na řepce)

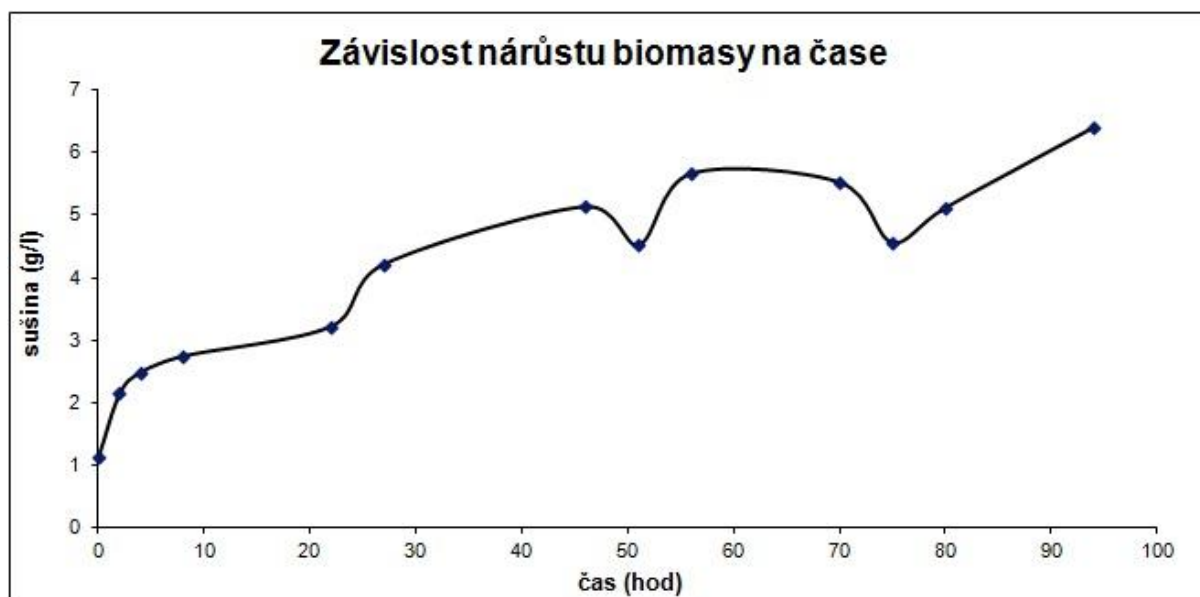
Tab. 11 Hodnoty absorbance a sušiny v závislosti na době kultivace u *Sporobolomyces roseus*

hod	A (*10)	Sušina (g/l)
0	0,164	1,12
2	0,344	2,14
4	0,412	2,48
8	0,536	2,74
22	0,836	3,22
27	0,936	4,22
46	1,134	5,14
51	0,984	4,52
56	1,284	5,67
70	1,244	5,53
75	0,974	4,56
80	1,120	5,12
94	1,426	6,41

Graf 9 Kalibrační křivka kvasinky *Sporobolomyces roseus*



Graf 10 Závislost nárůstu biomasy na době kultivace *S. roseus*



Z grafů 9 a 10 ocharakterizujeme růstovou křivku *Sporobolomyces roseus*. Jako typická karotenogenní kvasinka vykazuje dvoustupňový nárůst.

První mírné maximum se nachází kolem 25. hodiny. Tady karotenogenní kvasinky přichází do mírně zpomaleného růstu, ale pak zase pokračuje růst v poslední části exponenciální fáze. Druhé maximum je kolem 45. hodiny a růst následně přechází do stacionární fáze.

5.1.2 Produkce karotenoidů v průběhu růstu různých kmenů kvasinek

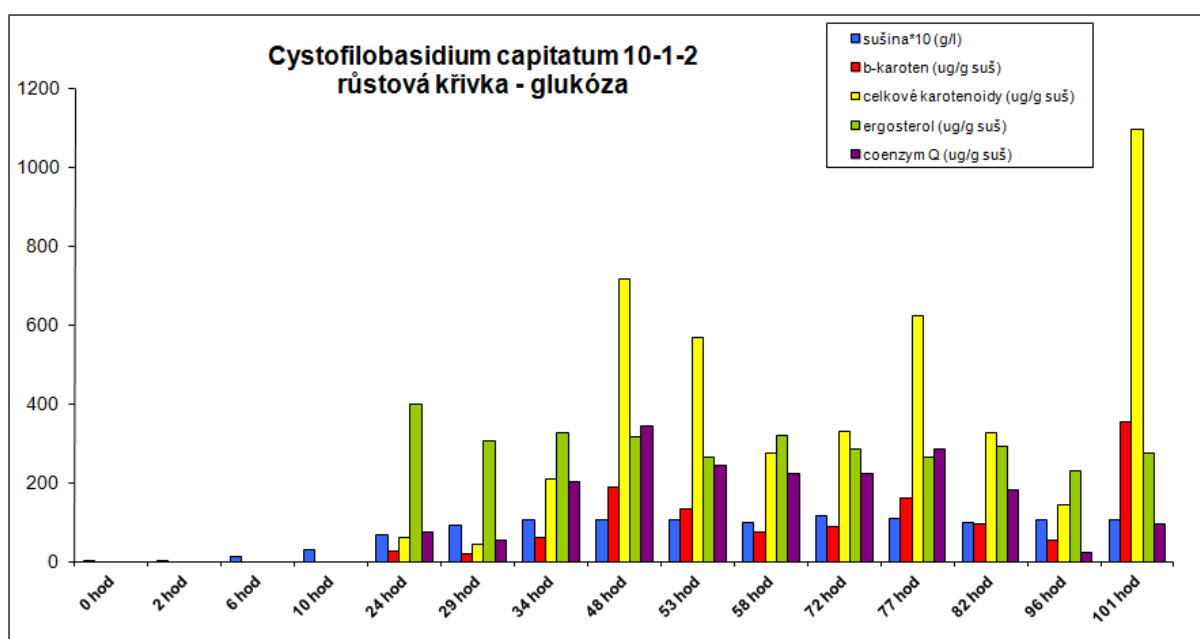
Během růstu karotenogenních kvasinek byly sledované nejen nárůsty sušiny a zákalu, ale také obsah β -karotenu a ergosterolu. Produkce těchto metabolitů jsou uvedené v tabulkách 12 až 16 a grafech 11 až 15. Analýza probíhala pomocí metody HPLC s PDA detekcí, se separací na koloně Kinetex C18 (5 μ m, 4,6 x 150 mm).

5.1.2.1 *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 (kultivace na glukóze)

Tab. 12 Množství vyprodukovaných metabolitů v čase u *C. capitatum* (10-1-2)

hod	sušina (g/l)	β -karoten (ug/g suš.)	ergosterol (ug/g suš.)
24 hod	6,660	25,145	399,136
29 hod	9,046	17,868	306,789
34 hod	10,515	58,968	324,546
48 hod	10,515	189,247	314,664
53 hod	10,680	131,591	262,291
58 hod	9,819	74,579	317,845
72 hod	11,619	86,270	284,918
77 hod	10,868	160,062	263,818
82 hod	9,742	95,167	292,310
96 hod	10,360	54,664	229,191
101 hod	10,614	354,820	273,720

Graf 11 Grafické znázornění produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 v závislosti na čase - glukóza



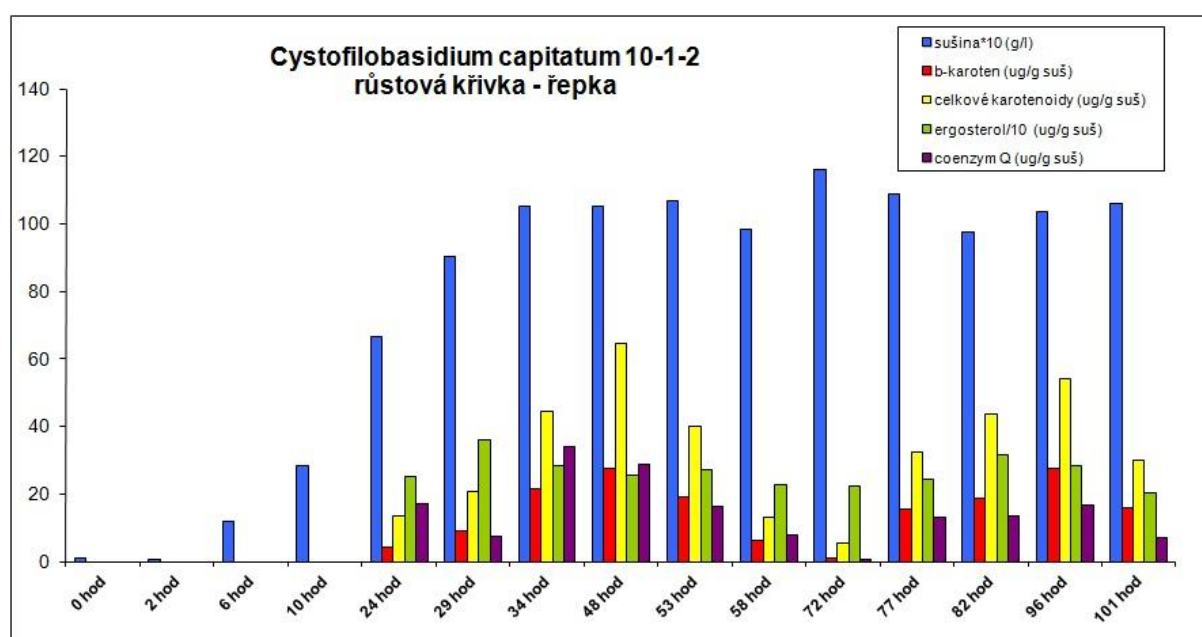
5.1.2.2 *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 (řepka 1)

Tab. 13 Množství vyprodukovaných metabolitů v čase u *C. capitatum* (10-1-2)

hod	sušina (g/l)	β -karoten (ug/g suš.)	ergosterol (ug/g suš.)
24 hod	6,660	4,199	251,222
29 hod	9,046	9,123	360,971
34 hod	10,515	21,690	285,587
48 hod	10,515	27,503	255,298

53 hod	10,680	19,002	271,275
58 hod	9,819	6,190	226,239
72 hod	11,619	0,912	221,795
77 hod	10,868	15,625	244,358
82 hod	9,742	18,537	314,442
96 hod	10,360	27,374	285,006
101 hod	10,614	16,008	201,375

Graf 12 Grafické znázornění produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 v závislosti na čase – řepka 1



Výše jsou znázorněné výsledky růstových křivek jednoho kmene *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2, ale na dvou různých substrátech – glukóza a řepka (výlisky 1 s nižším obsahem oleje). Hlavní pigment, který sledujeme, je β -karoten. Z grafu 11 je vidět, že první maximum při kultivaci na glukóze je v 48. hodině. Pak zase v poslední 101. hodině je druhé maximum. Množství β -karotenu se zvyšuje zároveň s množstvím biomasy. U ergosterolu je vidět nárůst produkce hlavně od 24. do 48. hodiny. Občasné maximum je možné spatřit během stacionární fáze. V grafu 12, kde produkce pigmentů probíhala na odpadním substrátu, můžeme pozorovat první maximum β -karotenu ve 48. hodině a druhé až v 96. hodině. Množství sušiny se zvyšuje také postupně exponenciálně. Maximalní množství ergosterolu bylo zejména od 29. do 53. hodiny. Z těchto výsledků je vidět, že kvasinka *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 na glukóze je schopná produkovat větší množství β -karotenu, než na řepkovém substrátu. Ergosterol je ve stejném podílu, jak na řepce, tak na glukóze. Použitý typ řepkového substrátu nemá s časem na kvasinkovou produkci výrazný vliv.

5.1.2.3 *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 (kultivace na glukóze)

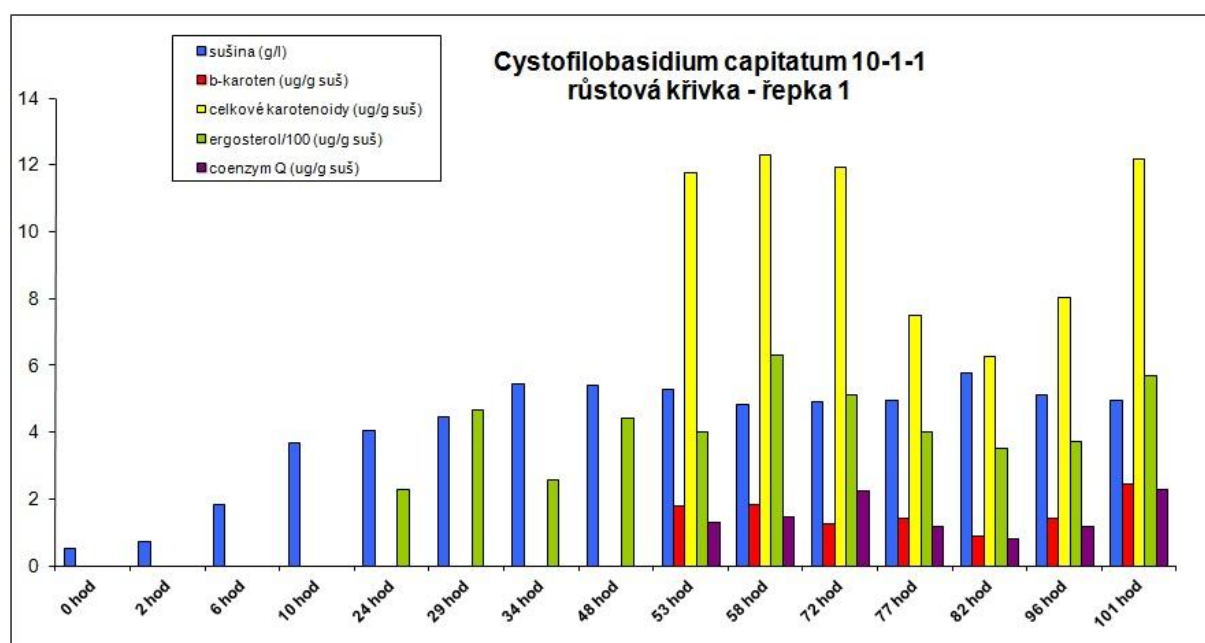
Růstová charakteristika karotenogenní kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1, kdy hlavní složkou produkčního média byla glukóza, byla provedena v předchozích pracích [3].

5.1.2.4 *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 (řepka - 1)

Tab. 14 Množství vyprodukovaných metabolitů v čase u *C. capitatum* (10-1-1)

hod	sušina (g/l)	β -karoten (ug/g suš.)	ergosterol (ug/g suš.)
24 hod	4,054	-	227,993
29 hod	4,435	-	466,318
34 hod	5,454	-	257,614
48 hod	5,383	-	439,859
53 hod	5,268	1,772	401,642
58 hod	4,816	1,813	630,612
72 hod	4,887	1,238	512,762
77 hod	4,940	1,399	401,493
82 hod	5,765	0,885	352,886
96 hod	5,100	1,396	373,565
101 hod	4,931	2,449	570,252

Graf 13 Grafické znázornění produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 v závislosti na čase



V dané kapitole byly uvedeny výsledky růstové křivky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 na řepce. Z grafu 13 je možné pozorovat první maximum produkce β -karotenu v 58. hodině a druhý v 101. hodině. Největší obsah ergosterolu byl v 58. hodině a potom následoval mírný pokles. Oproti růstové křivky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 na řepce *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 za stejných podmínek vyprodukovala nepatrné množství β -karotenu. Proto můžeme tvrdit, že kmen *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 je mnohem lepší pro potenciální využití odpadního substrátu v biotechnologii.

5.1.2.5 *Sporobolomyces roseus* (kultivace na glukóze)

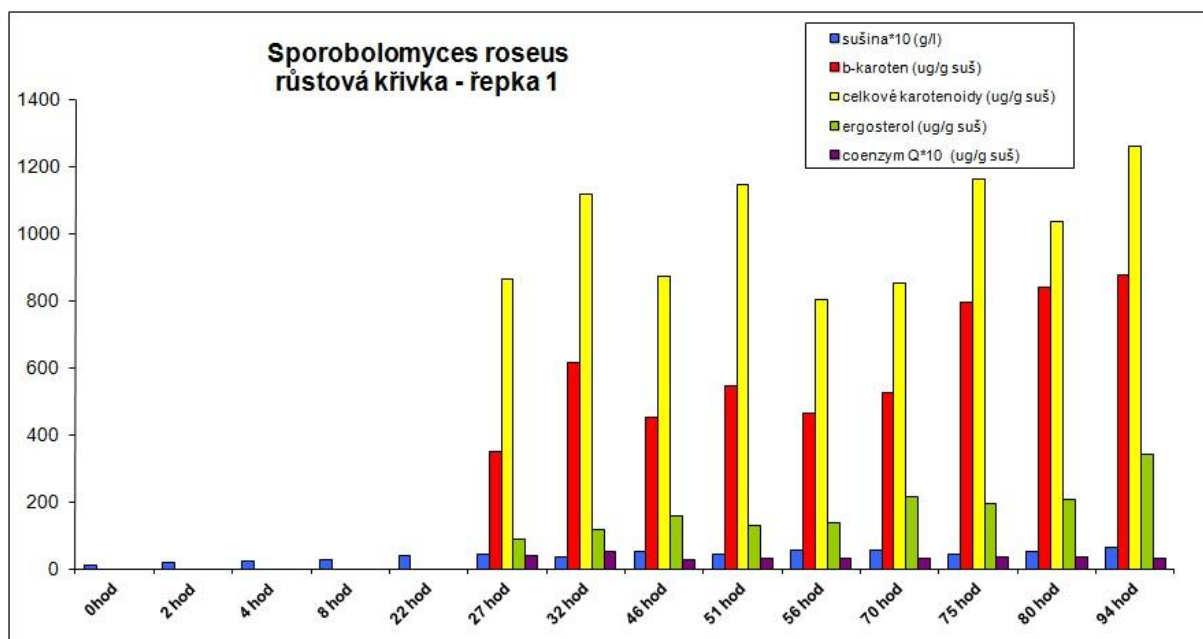
Růstová charakteristika karotenogenní kvasinky *Sporobolomyces roseus*, zde hlavní složkou produkčního média byla glukóza, byla provedena v předchozích pracích [29].

5.1.2.6 *Sporobolomyces roseus* (řepka - 1)

Tab. 15 Množství vyprodukovaných metabolitů v čase u *Sporobolomyces roseus*

hod	sušina (g/l)	β -karoten (ug/g suš.)	ergosterol (ug/g suš.)
22 hod	3,853	-	-
27 hod	4,268	348,195	86,159
32 hod	3,646	613,675	114,978
46 hod	5,089	451,064	156,862
51 hod	4,467	546,729	129,590
56 hod	5,711	463,360	135,231
70 hod	5,545	526,321	213,739
75 hod	4,425	793,207	194,073
80 hod	5,031	839,861	205,542
94 hod	6,299	876,479	342,523

Graf 14 Grafické znázornění produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *S. roseus* v závislosti na čase



V grafu 14 jsou znázorněny výsledky růstové křivky kmene *Sporobolomyces roseus*, kultivace probíhala na řepce 1. Produkce biomasy byla podstatně nižší (asi poloviční) než u ostatních testovaných kmenů. Nejvyšší produkce karotenoidů byla na začátku v 32. hodině a pak ve druhém maximu v 94. hodině. Největší nárůst produkce ergosterolu byl od 70. do 94. hodiny. Ve srovnání s kmenem *Cystofilobasidium capitatum*, daný kmen vyprodukoval na odpodním substrátu podstatně větší množství β -karotenu. Hmotnost sušiny během stacionární fáze růstu je stále téměř stejná.

5.1.2.7 *Rhodotorula glutinis* (kultivace na glukóze)

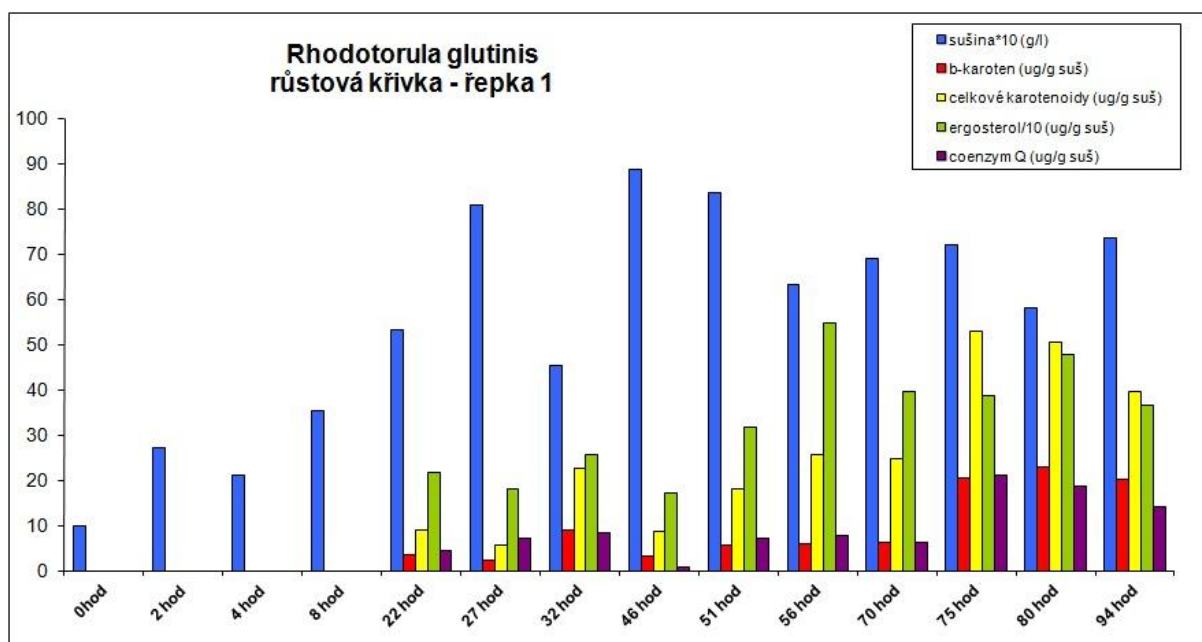
Růstová charakteristika karotenogenní kvasinky *Rhodotorula glutinis*, hlavní složkou produkčního média byla glukóza, byla provedena v předchozích pracích [29].

5.1.2.8 *Rhodotorula glutinis* (řepka 1)

Tab. 16 Množství vyprodukovaných metabolitů v čase u *Rhodotorula glutinis*

hod	sušina (g/l)	β -karoten (ug/g suš.)	ergosterol (ug/g suš.)
22 hod	5,327	3,540	215,215
27 hod	8,064	2,218	180,630
32 hod	4,543	8,954	256,169
46 hod	8,849	3,092	169,971
51 hod	8,356	5,509	315,260
56 hod	6,323	5,806	548,378
70 hod	6,907	6,318	395,968
75 hod	7,199	20,437	385,842
80 hod	5,810	23,013	477,523
94 hod	7,350	20,149	366,513

Graf 15 Grafické znázornění produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *R. glutinis* v závislosti na čase - řepka



V grafu 15 se nachází růstová charakteristika kvasinky *Rhodotorula glutinis*. Nejvíce β -karotenu bylo produkováno od 75. do 94. hodiny. Ergosterol měl opět největší množství v čase 56. až 80. hodina Schopnost produkce karotenoidů u této kvasinky můžeme porovnat s *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2.

5.2 Kultivace karotenogenních kvasinek, morfologické a produkční vlastnosti

Pro kultivaci kvasinek na optimálním médiu i v médiu s odpadním substrátem byly vybrány kmeny karotenogenních kvasinek *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* a *Cystofilobasidium capitatum*. Podmínky kultivace a složení jednotlivých médií je popsáno v kapitole 4.3.1.

5.2.1 Morfologické a růstové charakteristiky studovaných karotenogenních kvasinek kultivovaných na řepkovém substrátu

Kvasinky byly kultivovány v produkčních médiích obsahujících řepkový substrát dvou druhů (složení uvedeno v tab. 17) v různých poměrech s glukózou jako zdroje uhlíku. Jako kontrolní médium bylo použito médium s obsahem glukózy, která byla jediným zdrojem uhlíku. Kultivace probíhaly souběžně po dobu 96 hodin. Po skončení kultivace byly pozorovány morfologické znaky – tvar buněk charakterizující vliv složení média na růst kvasinek a celkové zabarvení média, které umožňuje pouhým pozorováním sledovat produkci případně nadprodukci karotenoidů v jednotlivých médiích.

Pro lepší pozorování zabarvení médií a následné porovnávání s kontrolním médiem, byla média nejdříve přefiltrována přes vícekrát složenou gázu, aby se odstranil barevný efekt odpadního substrátu.

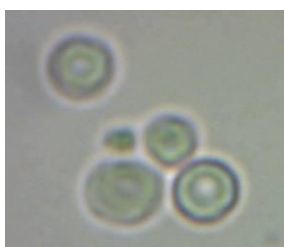
Tab. 17 Shrnutí výsledků kompoziční analýzy řepkových výlisků [%]

vzorek	lipidy	celulóza	lignin	sušina	popel	dusík	redukující sacharidy [mg/100 g řepky]
1	2,50	17,35	0,25	89,25	7,02	4,68	20,89
2	9,00	10,85	1,13	94,14	6,25	5,51	29,27

5.2.1.1 *Rhodotorula glutinis*



Kontrola



Kontrola



75 glu + 25 řl



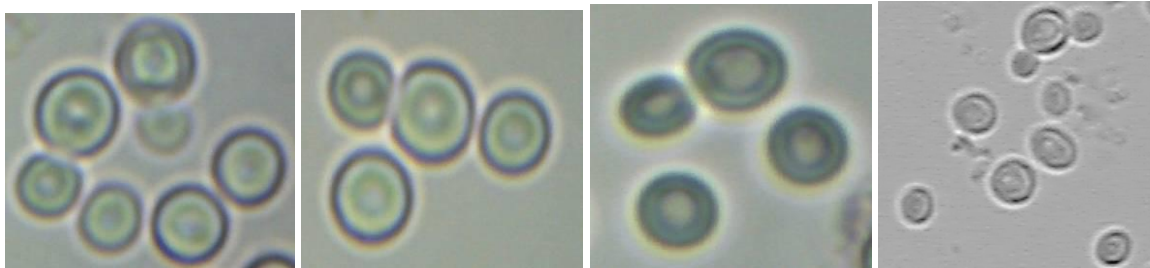
50 glu + 50 řl



25 glu + 75 řl



100 řl



75 glu + 25 ř1

50 glu + 50 ř1

25 glu + 75 ř1

100 ř1

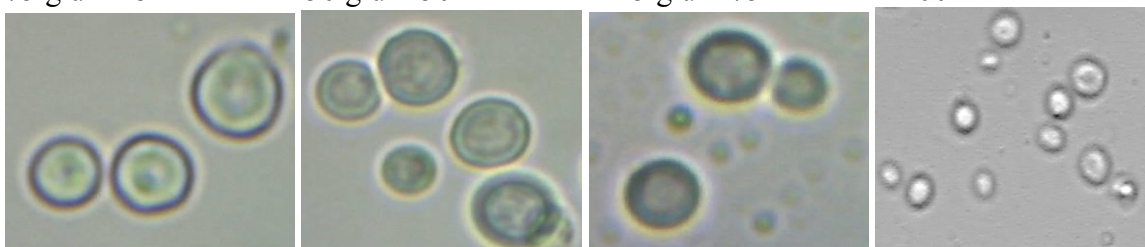


75 glu + 25 ř2

50 glu + 50 ř2

25 glu + 75 ř2

100 ř2



75 glu + 25 ř2

50 glu + 50 ř2

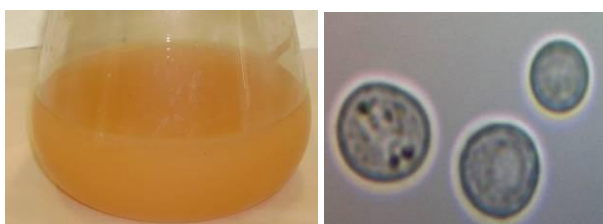
25 glu + 75 ř2

100 ř2

Dle mikroskopického pozorování můžeme vidět, jak se chovaly buňky v jednotlivých médiích. Buňky z kontrolního média obsahují drobné vakuoly, které signalizují už starší buňky ve stacionární fázi růstu. Buňky z médií obsahujících odpadní řepkový substrát také obsahují viditelné vakuoly. Tyto vakuoly se však zvětšují a prohlubují se se zvyšující se koncentrací odpadního substrátu. Buňka takto pravděpodobně reagovala na postupné hladovění, tedy vyčerpání uhlíkového zdroje v kultivačním médiu.

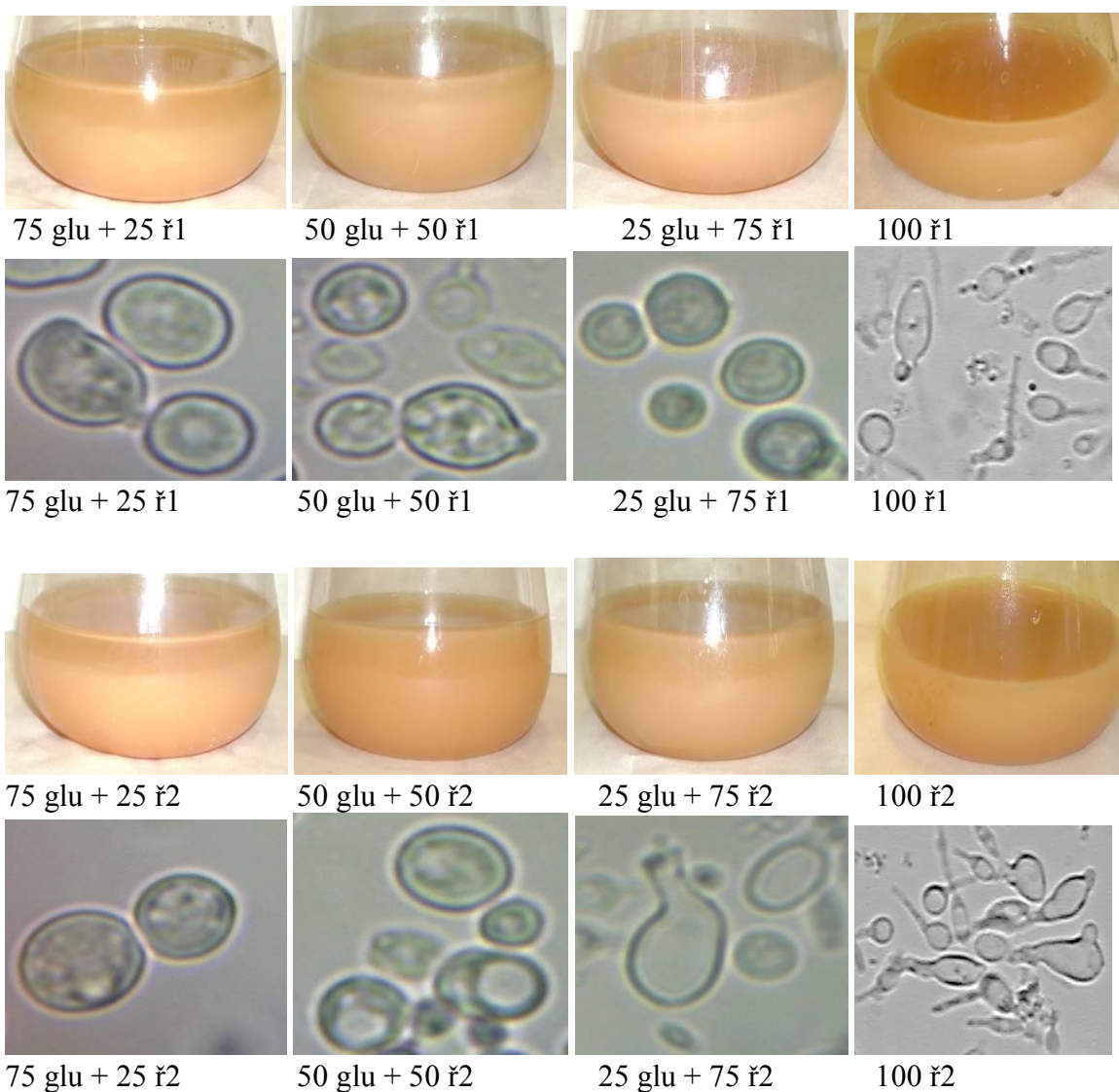
Na uvedených fotografiích z produkčních médií je vidět odlišné zabarvení. Kontrolní médium se výrazně liší od médií s odpadním substrátem. Řepková média mají narůžovělý charakter zabarvení oproti oranžovému kontrolnímu médiu. Barvy pravděpodobně odpovídají změnám v distribuci jednotlivých karotenových pigmentů syntetizovaných v dané buňce v závislosti na složení produkčního média.

5.2.1.2 *Sporobolomyces roseus*



Kontrola

Kontrola

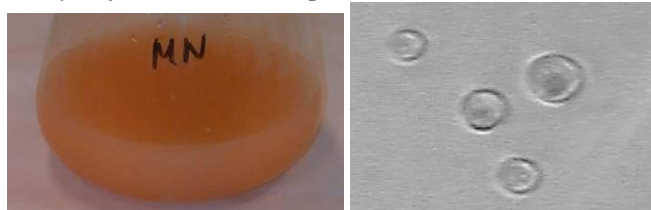


Na kvasinkových buňkách kmene *Sporobolomyces roseus* jsou nejvíce patrné změny, které nastaly v jednotlivých produkčních médiích. Buňky kontrolního média jsou okrouhlé, plné, bez značných známek stresu. Buňky produkčních médií s odpadním řepkovým substrátem se od kontrolního média liší. Se vzrůstající koncentrací přídavku řepky do média jsou buňky více protáhlé, zvrásněné, obsah buňky tvoří vychlípeniny ven z oválné struktury. Je vidět množství deformací způsobených odoláváním buňky stresovému prostředí.

V zabarvení médií i u tohoto kvasinkového kmene jsou odlišnosti mezi kontrolním médiem a odpadními médii, kde řepkové substráty měly vliv na tvorbu pigmentů s narůžovělým zabarvením. Ze sytosti růžové barvy produkčních médií s obsahem řepky lze usuzovat, že zvýšená produkce karotenoidů bude pravděpodobně v médiích s koncentrací řepky a glukózy 50/50.

5.2.1.3 *Cystofilobasidium capitatum*

a) *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1



Kontrola

Kontrola

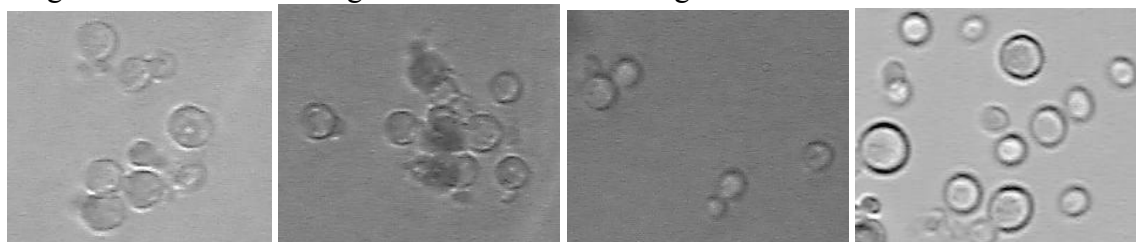


75 glu + 25 ř1

50 glu + 50 ř1

25 glu + 75 ř1

100 ř1



75 glu + 25 ř1

50 glu + 50 ř1

25 glu + 75 ř1

100 ř1

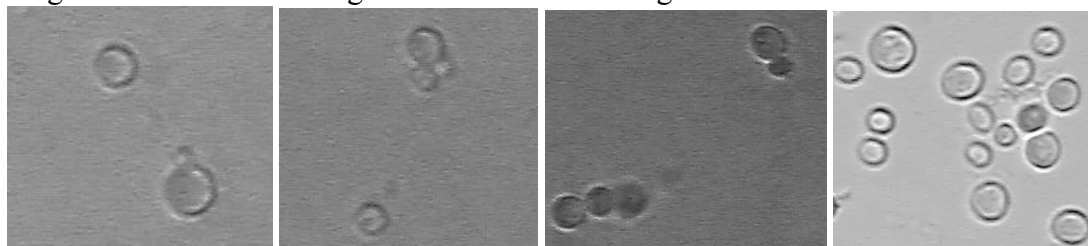


75 glu + 25 ř2

50 glu + 50 ř2

25 glu + 75 ř2

100 ř2



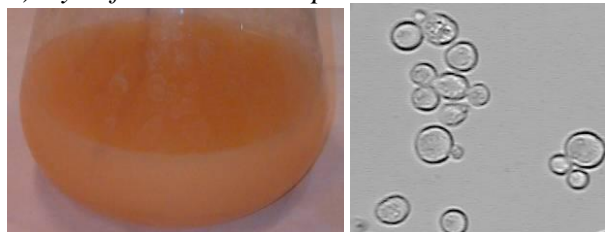
75 glu + 25 ř2

50 glu + 50 ř2

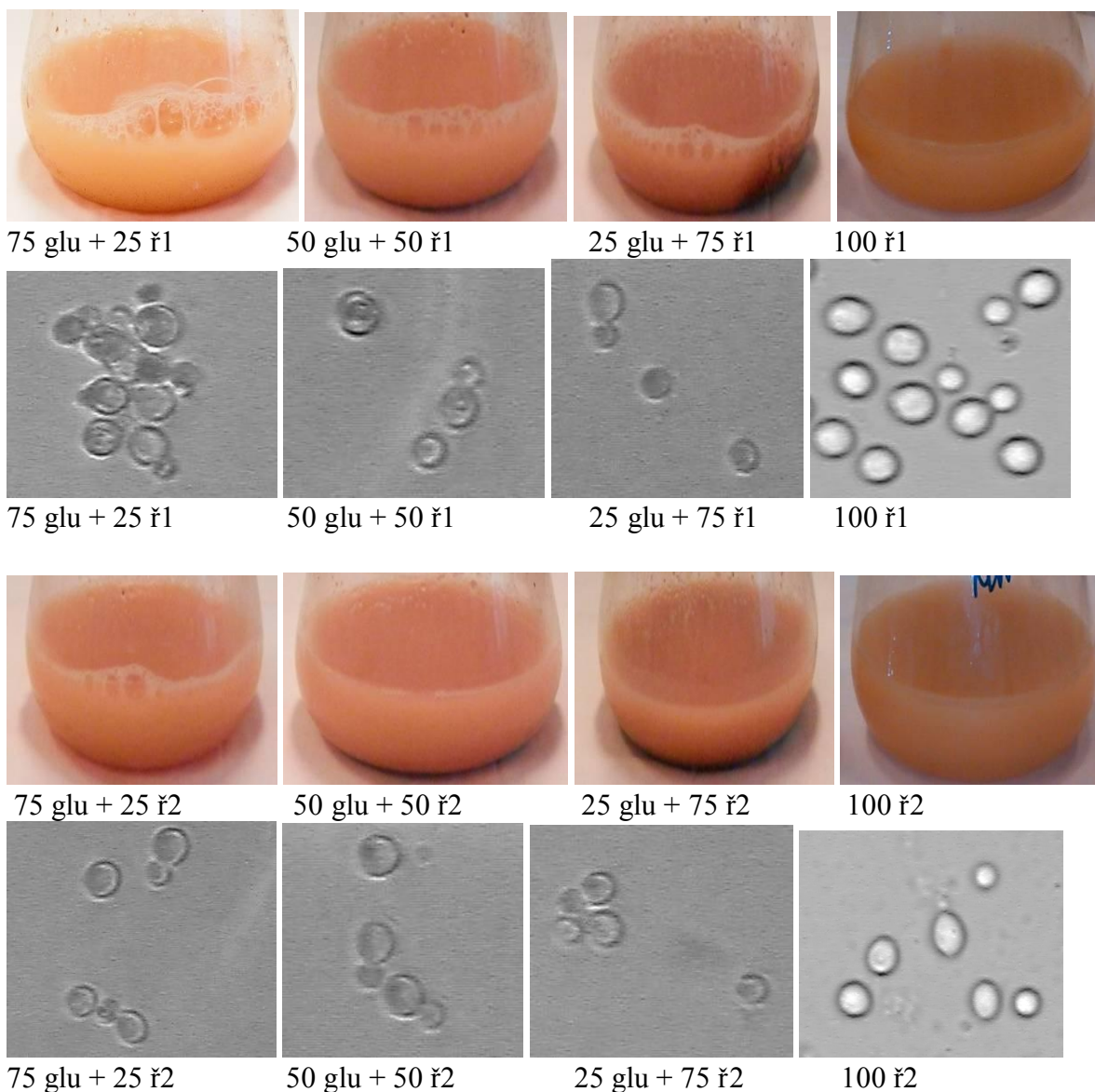
25 glu + 75 ř2

100 ř2

b) *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2



Kontrola



Mikroskopické pozorování kvasinkových buněk u obou typů kmene *Cystofilobasidium capitatum* vykazuje, že buňky jsou sice kulaté v řepkových i v kontrolních médiích, ale přidavek odpadního substrátu způsobuje shlukování buněk. Shlukování je typický příklad chování stresovaných buněk v živném médiu. Při porovnání chování buněk v jednotlivých typech kultury nejsou patrné žádné velké odlišnosti.

Na fotografiích kultivačních baněk můžeme pozorovat spíše růžové zabarvení médií s řepkovým substrátem. Kontrolní média vykazují více oranžové barvy. I u kmenů *Cystofilobasidium capitatum* dochází v přítomnosti odpadního řepkového substrátu ke změně pigmentového profilu oproti klasické kultivaci v glukózovém médiu.

5.2.2 Analýza karotenoidů a vybraných lipidických látek

Práce byla zaměřena na sledování změn v produkci β -karotenu, jako majoritního metabolitu většiny karotenogenních kvasinek, a taky na množství celkových karotenoidů, které mají praktický význam v různých odvětvích průmyslu. Z dalších metabolitů se sledovala produkce ergosterolu, doprovodného metabolitu produkovaného souběžně s karotenoidy s aktivitou jako provitamin D, a produkce ubiquinonu. Ubichinon, nebo-li koenzym Q, je důležitá

biochemická sloučenina, která se využívá mimo jiné jako nutriční doplněk stravy pro své účinky v prevenci kardiovaskulárních onemocnění a proti stárnutí.

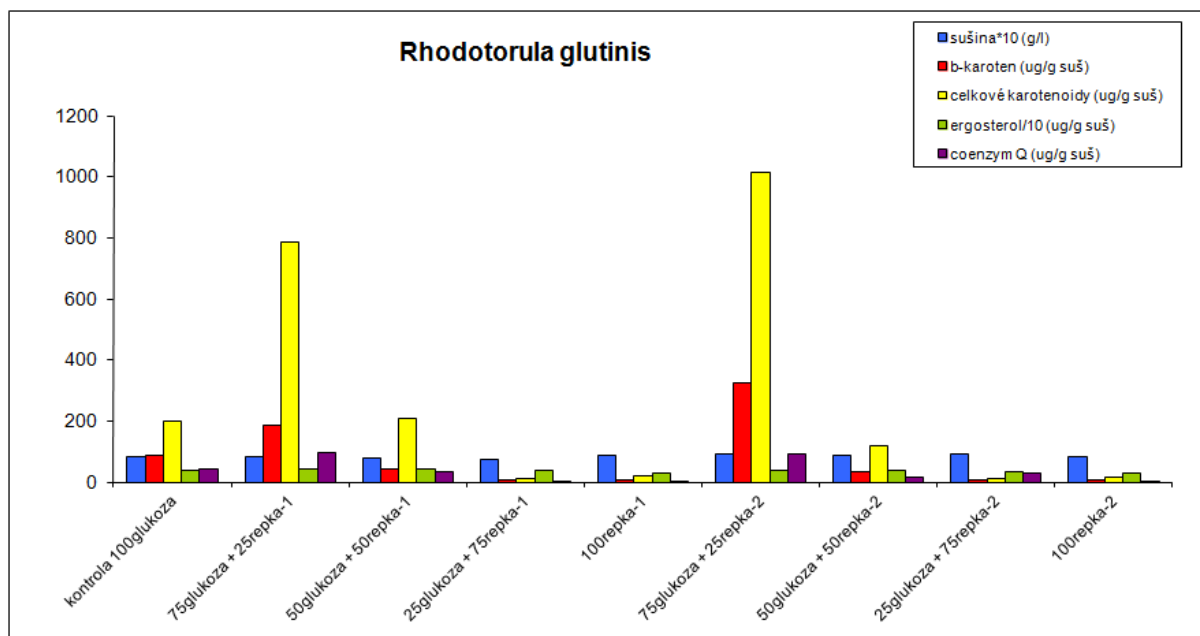
Analýza sledovaných metabolitů probíhala na chromatografické koloně Kinetex metodou RP-HPLC s PDA detekcí (4.3.2.3). V následujících tabulkách a grafech jsou uvedeny výsledky ze všech kultivací.

5.2.2.1 *Rhodotorula glutinis*

Tab. 18 Přehled produkce karotenoidů a lipidických látek produkovaných kvasinkou *Rhodotorula glutinis* na produkčních médiích s obsahem řepkového substrátu

Označení kultury	Sušina (g/l)	β -karoten (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Ubichinon (ug/g suš)
Kontrola	7,87	92,74	213,43	390,42	47,52
75 glu + 25 ř1	7,96	196,05	836,17	462,81	102,38
50 glu + 50 ř1	7,44	45,95	221,21	452,04	34,82
25 glu + 75 ř1	6,78	6,49	14,36	407,73	1,60
100 ř1	6,14	9,36	20,57	312,30	0,41
75 glu + 25 ř2	8,55	345,73	1077,24	386,42	95,20
50 glu + 50 ř2	8,23	35,55	125,25	397,65	14,42
25 glu + 75 ř2	8,68	4,94	9,99	346,35	31,38
100 ř2	7,58	8,60	16,23	299,55	3,83

Graf 16 Grafické znázornění produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Rhodotorula glutinis* na produkčních médiích s obsahem řepkového substrátu



Z hlediska produkce karotenoidů a sledovaných lipidických látek se řepkový substrát 1 s nižším obsahem lipidů zdál být vhodnějším substrátem. Avšak produkce biomasy byla vyšší právě na řepkovém substrátu 2, kde hodnoty převyšovaly i kontrolní médium (Graf 16).

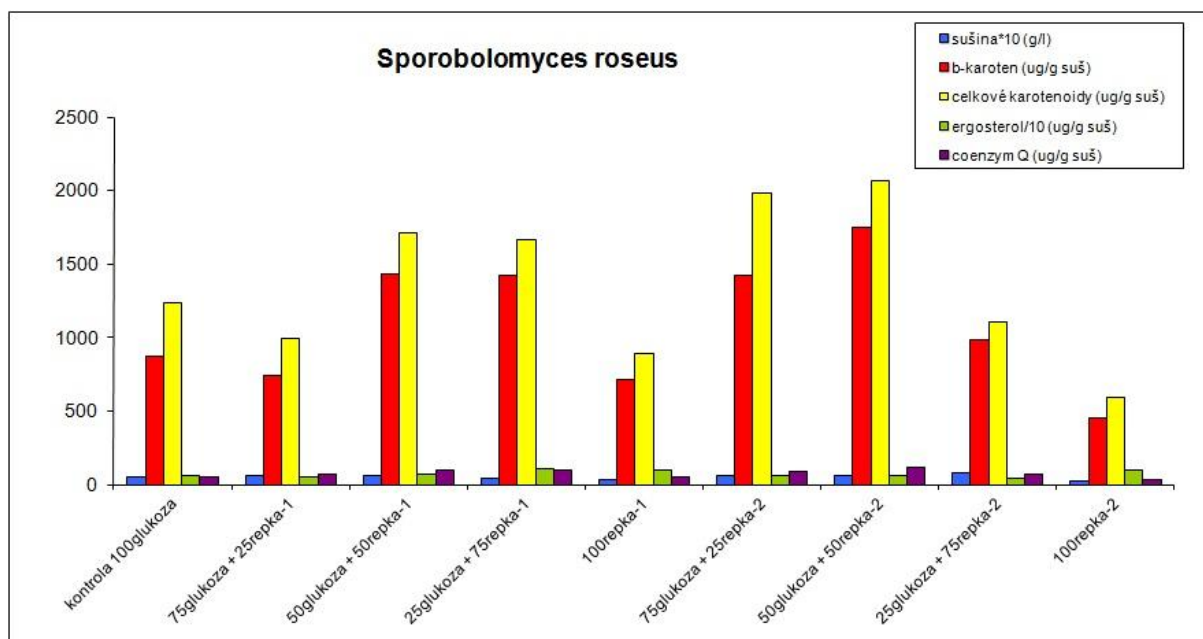
Nejvyšší produkce všech metabolitů a biomasy byla jednoznačně v médiích s přidavkem odpadního substrátu v koncentraci 25 % z celkových uhlíkatých zdrojů (poměr řepka:glukóza 1:3) v porovnání s kontrolním médiem (glukóza). Při zvyšující se koncentraci řepky a zároveň snižující se koncentraci glukózy se produkce sledovaných metabolitů pravidelně snižovala. Můžeme říct, že malý přídavek odpadního řepkového substrátu do produkčního média má u kvasinky *Rhodotorula glutinis* vliv na zvýšenou produkci karotenoidů a jiných metabolitů pravděpodobně jako stresová odezva na adaptaci novým podmínkám. Zvyšující se koncentrace odpadního substrátu už mají spíše negativní vliv na růst buněk a produkci, což může být způsobeno také většími koncentracemi inhibičních látek a antinutrientů v daném substrátu.

5.2.2.2 *Sporobolomyces roseus*

Tab. 19 Přehled produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Sporobolomyces roseus* na produkčních médiích s obsahem řepkového substrátu

Označení kultury	Sušina (g/l)	β -karoten (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Ubichinon (ug/g suš)
Kontrola	5,10	835,00	1 189,76	541,67	45,50
75 glu + 25 ř1	6,10	719,70	955,54	491,75	63,11
50 glu + 50 ř1	5,88	1 383,07	1 655,60	646,73	97,76
25 glu + 75 ř1	4,60	1 364,35	1 592,11	985,17	94,81
100 ř1	3,03	671,75	830,35	931,19	48,81
75 glu + 25 ř2	6,40	1 374,08	1 915,25	627,64	85,82
50 glu + 50 ř2	6,22	1 694,81	1 992,99	630,13	108,64
25 glu + 75 ř2	8,26	954,18	1 075,60	397,21	64,63
100 ř2	2,89	422,59	548,15	884,32	33,89

Graf 17 Grafické znázornění produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Sporobolomyces roseus* na produkčních médiích s obsahem řepkového substrátu



Kvasinka *Sporobolomyces roseus* reagovala na přidavek řepkového substrátu do produkčního média podobně jako *Rhodotorula glutinis* (Graf 17). Avšak snášela i vyšší koncentrace řepky, kde byla produkce sledovaných metabolitů dokonce vyšší než u kontrolního glukózového média. Nejvyšší produkce karotenoidů a lipidických látek byly v médiích s 50% koncentrací odpadního řepkového substrátu obou dvou typů. V médiu s přidavkem 50 % řepky typu 2 s větším obsahem lipidů byla produkce β -karotenu i celkových karotenoidů dvojnásobná v porovnání s kontrolním médiem. Při zvyšující se koncentraci řepky byla produkce pořád vyšší než u kontrolního média, ale zároveň už vykazovala klesající charakter. Kultivace *Sporobolomyces roseus* na 100% odpadním substrátu měla nejnižší produkci jak biomasy, tak i sledovaných metabolitů.

5.2.2.3 *Cystofilobasidium capitatum*

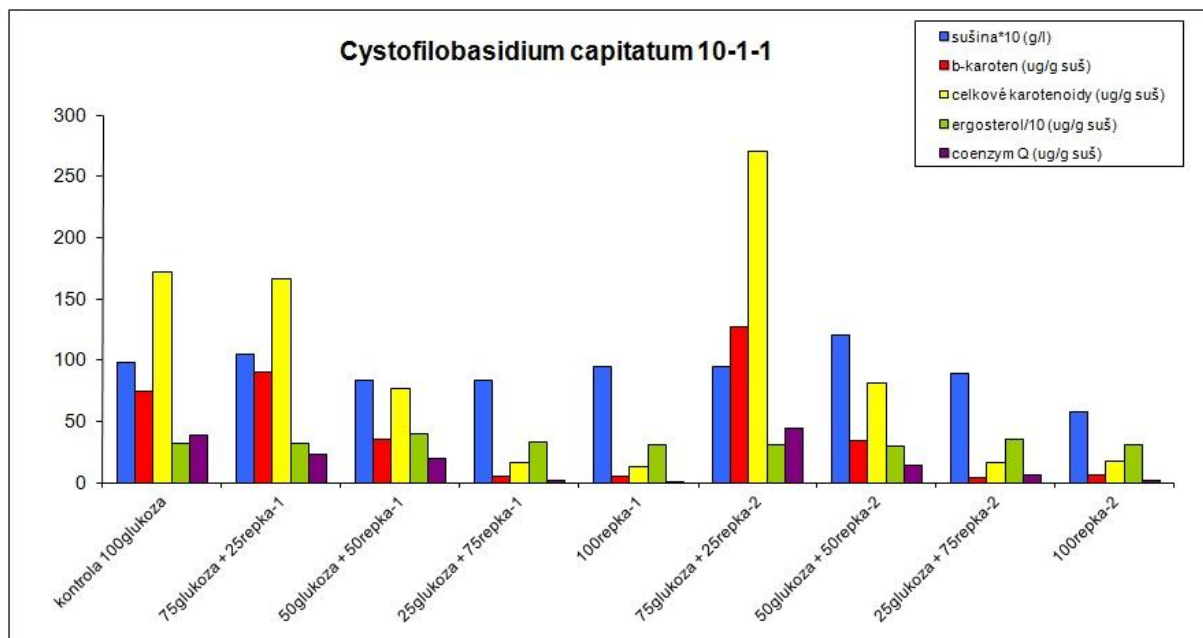
a) *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1

Tab. 20 Přehled produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 na produkčních médiích s obsahem řepkového substrátu

Označení kultury	Sušina (g/l)	β -karoten (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Ubichinon (ug/g suš)
Kontrola	9,79	74,60	171,67	314,03	38,22
75 glu + 25 ř1	10,43	89,85	166,70	314,92	23,43
50 glu + 50 ř1	8,36	35,50	76,34	397,15	19,68
25 glu + 75 ř1	8,29	4,51	16,19	331,59	1,71
100 ř1	9,45	5,53	12,34	304,39	0,80
75 glu + 25 ř2	9,51	126,65	270,51	309,77	43,90
50 glu + 50 ř2	11,99	34,48	81,44	297,23	13,83

25 glu + 75 ř2	8,94	3,69	16,26	349,83	5,62
100 ř2	5,74	6,62	16,95	303,18	1,58

Graf 18 Grafické znázornění produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-1 na produkčních médiích s obsahem řepkového substrátu

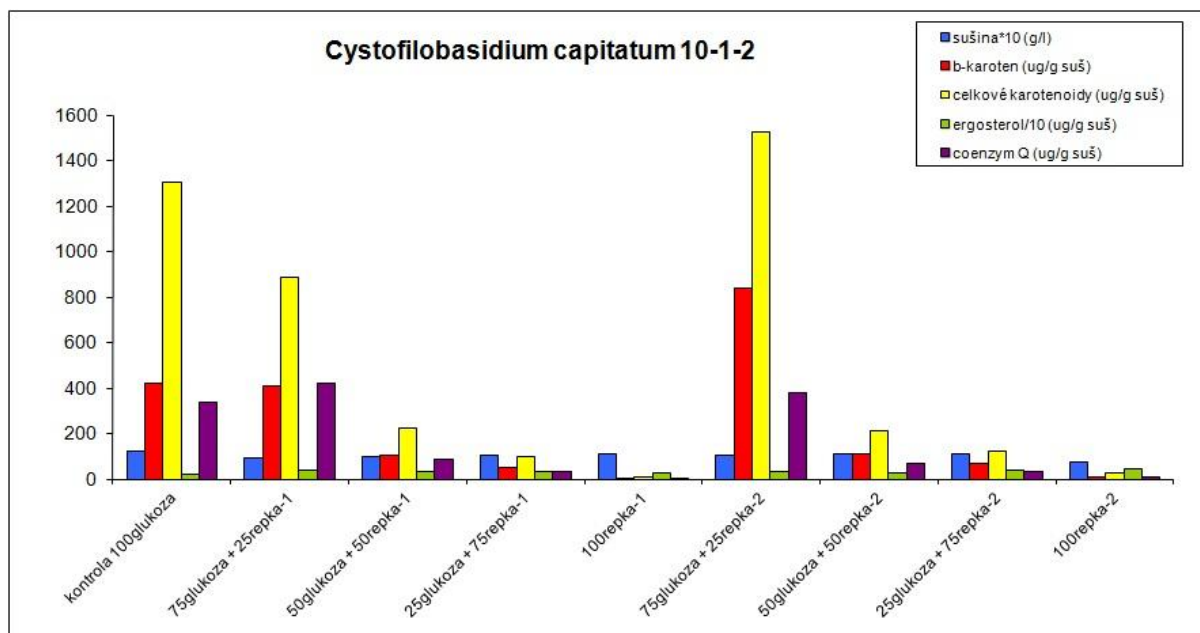


b) *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2

Tab. 21 Přehled produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 na produkčních médiích s obsahem řepkového substrátu

Označení kultury	Sušina (g/l)	β-karoten (ug/g suš)	Celkové karotenoidy (ug/g suš)	Ergosterol (ug/g suš)	Ubichinon (ug/g suš)
kontrola	12,43	419,69	1 303,83	227,55	339,63
75 glu + 25 ř1	9,44	407,86	885,58	359,01	421,12
50 glu + 50 ř1	9,96	101,68	221,26	340,90	86,96
25 glu + 75 ř1	10,28	52,14	99,43	310,73	31,45
100 ř1	9,37	6,54	10,86	301,63	4,03
75 glu + 25 ř2	10,64	836,90	1 523,28	354,26	378,67
50 glu + 50 ř2	11,03	110,98	210,51	293,10	66,93
25 glu + 75 ř2	11,03	69,87	123,74	389,70	35,69
100 ř2	7,51	11,70	26,00	444,43	8,40

Graf 19 Grafické znázornění produkce karotenoidů a lipidických látek kvasinkou *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 na produkčních médiích s obsahem řepkového substrátu



Kultivace na řepkových substrátech byla sledována i u kvasinkového druhu *Cystofilobasidium capitatum*. Byly použity dva kmeny tohoto druhu, a to *CCY 10-1-1* a *CCY 10-1-2*. Z uvedených tabulek a grafů je patrný velmi podobný průběh produkce karotenoidů a lipidických látek jako u kvasinky *Rhodotorula glutinis*. Nejvyšší produkce všech metabolitů byla v médiích s přidavkem odpadního substrátu v koncentraci 25 % oproti kontrole, pak se produkce pravidelně snižuje se vzrůstající koncentrací řepkového substrátu. Použitý typ řepkového substrátu (tj. obsah oleje v odpadním substrátu) nemá na kvasinkovou produkci výrazný vliv. Odlišnosti jsou patrné jedině v médiu s nejvyššími produkcemi, kde typ řepky s vyšším obsahem lipidů se zdá být vhodnějším substrátem.

Při porovnání produkčních vlastností obou kmenů *Cystofilobasidium capitatum*, můžeme říct, že kmen *CCY 10-1-2* má mnohem vyšší produkci samotné biomasy i sledovaných metabolitů než kmen *CCY 10-1-1* a to v kontrolním médiu, nebo v médiu s obsahem odpadního substrátu. Z výsledků se vyplývá, že kvasinkový kmen *Cystofilobasidium capitatum CCY 10-1-2* je pro biotechnologické využití mnohem více perspektivní.

6 ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo studium produkčních vlastností karotenogenních kvasinek na odpadním řepkovém substrátu. Řepkové výlisky jsou dobrým zdrojem energie a bílkovin, často se používají jako přídatek do krmných směsí. Nevýhodou je jednak relativně vysoký podíl lipidů, což snižuje dobrou stravitelnost u zvířat, a dále obsah antinutričních faktorů, což omezuje bezproblémové využití v krmivářství.

V práci byly provedeny kultivace s dvěma typy řepkového substrátu s rozdílným obsahem lipidů. Sledovaly se rozdíly v produkci biomasy, karotenoidů i vybraných lipidických látek v jednotlivých produkčních médiích u třech kmenů karotenogenních kvasinek.

U všech kmenů byly provedeny růstové charakteristiky na řepkovém substrátu prvního typu s nižším obsahem lipidů. Charakteristiky se stanovovaly z důvodu lepšího porozumění samotnému růstu kvasinek na odpadním substrátu s cílem zjistit rozdíly v rychlosti růstu, a potřebné doby kultivace k syntéze sledovaných metabolitů oproti klasickým kultivacím na glukózovém kontrolním médiu. U kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* 10-1-2 byla provedena růstová charakteristika i na samotném glukózovém médiu. Růstové křivky na glukóze u ostatních dvou kvasinkových kmenů byly provedeny už v předchozích studiích, proto se v předložené práci nestanovovaly.

Kompletní růstová charakteristika se skládá ze sestavení růstových křivek, stanovení množství biomasy a analýzy produkce karotenoidů a sterolových látek v průběhu růstu. Zjistilo se, že křivky mají převážně dvoufázový charakter, což odpovídá postupné konzumaci endogenních substrátů v pozdní stacionární fázi. Množství biomasy i metabolitů je nižší než u glukózových médií, avšak průběh produkce na řepce víceméně kopíruje průběh produkčních vlastností na glukóze.

Z výsledků analýzy karotenoidů a sledovaných lipidických látek pomocí metody RP-HPLC/PDA můžeme vidět, že produkce pigmentů, ergosterolu i ubichinonu jsou v exponenciální fázi růstu velice nízké. Buňky pravděpodobně syntetizovaly metabolity potřebné v první řadě k růstu a reprodukci. Z výsledků je patrné, množství sušiny se lineárně zvyšuje. Až ke konci exponenciální fáze, a hlavně ve fázi stacionární, začíná být množství sušiny víceméně konstantní a převažuje biosyntéza karotenoidů a sterolových látek.

V samotné kultivační části práce byly provedeny experimenty s alternativními zdroji uhlíku tak, že do produkčního média byl přidán řepkový substrát s glukózou v různých poměrech, kultivace byla provedena pro srovnání i na glukóze a na obou typech řepkových výlisků jako jediném zdroji uhlíku. Sledovalo se, jaká koncentrace odpadního substrátu má na kvasinkové kmeny vliv pro zvýšené nadprodukční vlastnosti a jaká koncentrace má spíše negativní vliv na produkci, tedy produkce je nižší než na kontrolním glukózovém médiu.

Produkční vlastnosti jednotlivých kmenů se od sebe lišily druhově. Zatímco u kvasinky *Rhodotorula glutinis* byla nejvyšší produkce všech metabolitů i biomasy v médiích s přidavkem řepky v koncentraci 25 % z celkových uhlíkatých zdrojů (řepka:glukóza 1:3), kvasinka *Sporobolomyces roseus* měla nejvyšší produkce při 50% koncentraci řepkového substrátu (řepka:glukóza 1:1). V médiu s přidavkem řepky s obsahem většího množství lipidů byla produkce karotenoidů dvojnásobná oproti kontrolnímu médiu. Co se týče produkčních

vlastností kmene *Cystofilobasidium capitatum*, mají podobný průběh jako u kvasinky *Rhodotorula glutinis*. Poměr řepka:glukóza 1:3 se jeví jako nejvhodnější množství odpadního substrátu pro nadprodukcí karotenoidů a vybraných lipidických látek, zvyšující se koncentrace řepky mají už spíše inhibiční efekt na růst i samotnou produkci metabolitů. V porovnání produkčních vlastností obou kmenů druhu *Cystofilobasidium capitatum* (10-1-1 a 10-1-2), má kmen 10-1-2 větší produktivitu biomasy i karotenoidů. Zdá se tedy, že tento kmen má větší možnosti ve využití v průmyslu.

Z výsledků vyplývá, že využití řepkových výlisků jako možného zdroje uhlíku ke kultivaci karotenogenních kvasinek a produkci karotenoidů a vybraných lipidických látek jakožto produktů s vyšší přidanou hodnotou se jeví jako vhodná varianta do určité koncentrace daného odpadu. Vyšší koncentrace řepky vykazují zpomalení růstu a nižší produkce metabolitů zapříčiněné pravděpodobně obsahem antinutričních látek v samotném odpadním substrátu. Po odstranění antinutrientů, případně po hydrolýze substrátu, kdy se uvolní vyšší množství sacharidových zdrojů, může dojít k vyšší produkci sledovaných pigmentů u karotenogenních kvasinek. Tyto pigmenty by pak mohly být využity v potravinářském či farmaceutickém průmyslu. Upravené řepkové substráty s obohacenou kvasinkovou biomasou mohou být využitelné v krmivářském průmyslu jako krmivo s vyšší nutriční hodnotou. Úprava řepkového substrátu s následnou kultivací je vhodný cíl k dalšímu studiu v navazujících pracích.

7 LITERATURA

- [1] Masák J., Pelechová J., Plachý J.: Speciální mikrobiální technologie, VŠCHT Praha, 1992
- [2] Velíšek J.: Chemie potravin 3. 1. vyd. Tábor: Osis, 1999.
- [3] HÁRONIKOVÁ, A. Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 92 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [4] FRENGOVA, G. I., BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 36, no. 2, p. 163-180. ISSN: 1898-2370.
- [5] Vodrážka Z.: Biochemie, Academia Praha, 1996
- [6] Richtera M., Páca J.: Bioinženýrství kvasných procesů, 1985
- [7] ŠILHÁNOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. rozšířené vydání. Praha : ACADEMIA, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [8] Kocková-Kratochvilová A.: Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy, Alfa Bratislava, 1982
- [9] <http://www.osel.cz/tisk.php?clanek=6105>
- [10] TALARO A. and TALARO K. P.: Foundations in Microbiology. 2001, Pasadena: McGraw-Hill. p. 889, ISBN 0-07-248864-6
- [11] BHALLA T. CH., SHARMA N. N. and SHARMA M.: Production of metabolites, Industrial enzymes, Amino acid, Organic acids, Antibiotics, Vitamins and Single cell proteins. *Food and Industrial Microbiology*, (electronic, dostupné na: <http://www.scribd.com/doc/35081543/Enzymes-in-Food-Tech-Good>)
- [12] Kocková-Kratochvilová A. a kol.: Kvasinky ve výzkumu a praxi, Academia Praha, 1986
- [13] Kocková-Kratochvilová A.: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov, Alfa Bratislava, 1990
- [14] M. J. WAITES, N. L. MORGAN, J. S. ROCKEY, and G. HIGTON: *Industrial Microbiology: An Introduction*. 2001, Oxford: Wiley-Blackwell. ISBN 978-0-632-05307-0
- [15] G. M. WALKER: *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1998, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. 362 p. ISBN 0-471-964468 Frengova G. I., Beshkova D. M. 2009; Halienova A. a kol. 2007
- [16] ČERTIK, M., MAROVA, I., HANUSOVA, V., RAPTA, P., BREIEROVA, E. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2009. 25, *Biotechnological Production and Properties of Carotenoid Pigments*, p. 355-375. ISBN: 978-1-4200-7703-2.
- [17] KOLENA, J.; ŠIMÁČEK P.: Glycerin – odpad z výroby FAME, nebo cenný meziprodukt?. *Odpadové fórum 2009*, Milovy, 20. – 22. 4. 2009 [online]. 2009 [citováno 25.4.2011]. Dostupné na [www: http://www.petrochem.cz/upload/aprochem2009_190.pdf](http://www.petrochem.cz/upload/aprochem2009_190.pdf)

- [18] PAGLIARO, M., ROSSI, M.: Future of Glycerol. 2nd ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2010. 162 s. ISBN 978-1-84973-046-4.
- [19] UCAR, S., R. Ozkan, A.; Characterization of products from the pyrolysis of rapeseed oil cake. Bioresource Technology 2007, 2008 (99), 8771–8776.
- [20] SUCHÝ, P., STRAKOVÁ, E., HERZIG, I. Nutriční a dietetická hodnota tuzemských proteinových krmiv jako alternativa sóji a sójových produktů. Část II – řepka a řepkové produkty. 2007, str. 4-10.
- [21] Kracht W., Jeroch H., Dänicke S., Matzke W., Hennig, U., Schumann, W. (1999): Nutritional evaluation of rapeseed cake from dehulled rapeseed fed for piglets a growing-finishing pigs. In: New Horizons for an old crop. Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia. www.regional.org.au/au/gcirc/1/212.htm
- [22] Davídek J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL Praha, 1977
- [23] Churáček J., Jandera P., Separace látek – kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie, VŠCHT Pardubice, 1986
- [24] Zdráhal, Z., Plocek, J., Konečný, P., Chmelík, J.: Charakterizace biopolymerů hmotnostní spektrometrií, *Chemické listy* 91, 1997, s. 811-818
- [25] Barker, J.: *Mass Spectrometry*, Wiley-VCH, 2000
- [26] Štulík K.: *Analytické separační metody*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004.
- [27] Abian, J.: The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry, *Journal of mass spectrometry* 34, str. 157-168 , 1999
- [28] ČARNECKÁ, M. *Molecular study of intracellular changes as response of microorganisms to environment*. Brno, 2009. 120 p. PHD thesis at Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection. Supervised by Doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [29] DVOŘÁKOVÁ, T. *Využití odpadních surovin k produkci obohacené kvasinkové biomasy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 156 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PDA	Photodiode Array Detector
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RG	<i>Rhodotorula glutinis</i>
CC	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>
CCY 10-1-1	<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-1</i>
CCY 10-1-2	<i>Cystofilobasidium capitatum 10-1-2</i>
SR	<i>Sporobolomyces roseus</i>
glu+ř1,ř2	médium obsahující glukosu a řepku v určitých poměrech
kontrola	kontrolní médium obsahující glukosu